Postverlagsort Berlin

ZEITSCHRIFT FÜR ZELLFORSCHUNG UND MIKROSKOPISCHE ANATOMIE

HERAUSGEGEBEN UND REDIGIERT VON

W. BARGMANN
KIEL

B. SCHARRER
NEW YORK

J. SEILER
ZÜRICH

55. BAND, 5. HEFT

MIT 96 TEXTABBILDUNGEN IN 107 EINZELDARSTELLUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 4. DEZEMBER 1961)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1961

Z. Zellforsch.

Preis DM 49.60

Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie

Die Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie steht Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der beschreibenden und experimentellen Zellen- und Gewebelehre sowie dem Gebiet der mikroskopischen Anatomie des Menschen und der Tiere offen, wobei Arbeiten mit funktionellem und experimentellem Inhalt bevorzugt werden.

Arbeiten karyologischen Inhalts werden an die Zeitschrift „Chromosoma", Arbeiten zur histochemischen und histophysikalischen Grundlagenforschung, insbesondere ihrer Methodik, an die Abteilung „Histochemie" weitergeleitet.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung rascher Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind. Der Autor verpflichtet sich, sie auch nachträglich nicht an anderer Stelle zu publizieren. Mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag geht das Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder einschließlich des Rechts der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung an den Verlag über. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0.30 pro Seite zu verwenden. *Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.*

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Für den 16seitigen Druckbogen wird ein Unkosten-Ersatz von DM 20,—, jedoch höchstens DM 60,— für eine Arbeit vergütet.

Alle Manuskripte sind zu senden und Anfragen zu richten an:

Prof. Dr. W. Bargmann, Kiel, Anatomisches Institut der Universität, Neue Universität, Eingang F 1,

Prof. Dr. Berta Scharrer, Albert Einstein College of Medicine, Dept. of Anatomy, Eastchester Road and Morris Park Avenue, New York 61, N.Y., USA,

Prof. Dr. J. Seiler, Zürich 6, Sonneggstr. 45.

Springer-Verlag

Heidelberg 1, Postfach 3027, Fernsprecher 27901, Fernschreibnummer 04-61723
Berlin-Wilmersdorf, Heidelberger Platz 3, Fernsprecher 830301, Fernschreibnummer 01-83319

---

55. Band **Inhaltsverzeichnis** 5. Heft

Seite

VENUGOPALAN, V. K., Localization of ribo- and desoxyribo-nucleic acid in fish oocytes. With 4 Figures in the Text 617

WAINRACH, S., and J. R. SOTELO, Electron microscope study of the developing chick embryo heart. With 9 Figures in the Text 622

WORTHINGTON jr., W. C., J. R. SHEALY and J. L. BLAKELY, Histologic studies on the neurohypophysis of the living frog. With 6 Figures in the Text 635

WALD, F., and E. DE ROBERTIS, The action of glutamate and the problem of the "extracellular space" in the retina. An electron microscope study. With 7 Figures in the Text 649

STRUCK, E., Vergleichende Untersuchungen über das „Geschlechtschromatin" bei einigen Haustieren mit Hilfe des Buccaltests. Mit 9 Textabbildungen in 20 Einzeldarstellungen 662

VIALE, G., und G. APPONI, Histochemische Untersuchungen über die Cholinesterasen in der menschlichen Netzhaut. Mit 3 Textabbildungen 673

BUSSCHE-HADDENHAUSEN, U. VON DEM, Vergleichende Studien über Bau und Funktion des Amnions. Das Säugeramnion am Beispiel des Gürteltieramnions *(Dasypus novemcinctus)*. Mit 13 Textabbildungen 679

ROLLHÄUSER, H., und P. SANTAMARÍA-ARNÁIZ, Histophysiologische Untersuchungen über den Mechanismus der Schockwirkung auf die Durchblutung der Rattenniere. Mit 5 Textabbildungen 696

SCHMIDT, G. H., Sekretionsphasen und cytologische Beobachtungen zur Funktion der Oenocyten während der Puppenphase verschiedener Kasten und Geschlechter von *Formica polyctena* FOERST. (Ins. Hym. Form.). Mit 12 Textabbildungen 707

GANSLER, H., Struktur und Funktion der glatten Muskulatur. II. Licht- und elektronenmikroskopische Befunde an Hohlorganen von Ratte, Meerschweinchen und Mensch. Mit 28 Textabbildungen 724

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Zeitschrift für Zellforschung 55, 617—621 (1961)

Department of Zoology, Annamalai University
Annamalainagar, India

LOCALIZATION OF RIBO- AND DESOXYRIBO-NUCLEIC ACID IN FISH OOCYTES*

By

V. K. Venugopalan

With 4 Figures in the Text

(Received June 26, 1961)

Introduction

The fact that no synthesis of nucleic acid occurs during the early cleavage stages of development in sea-urchins (Needham and Needham 1930) and amphibians has led Brachet (1947) to assume that the fertilized ovum contains an extranuclear nucleic acid reservoir. Histochemical studies showed (Brachet 1947) that the reserve nucleic acid is RNA. No histochemical study confirmed the presence of DNA in the extranuclear region. This led Brachet (1947) and others to assume that the desoxyribonucleic acid is an exclusively chromosomal or nuclear component. Biochemical studies on the other hand have revealed (Hoff-Jørgensen and Zeuthen 1952, Hoff-Jørgensen 1954, Sze 1953) the existence of large quantities of DNA or DNA like materials in the cytoplasm of unfertilized eggs of amphibians.

The presence of reserve DNA in the cytoplasm of plant cells has also been demonstrated histochemically by Chayen and Norris (1953). However, Brachet (1957) is of the opinion that this reserve DNA might not really exist: and even if it exists its quantitative importance decreases when the specificity of the staining techniques used for DNA determination improves.

On the contrary, biochemical and microbiological assay studies on the nucleic acids in amphibian eggs by various workers (Grant 1958, Finnamore and Volkin 1958, Bieber et al. 1959, Løvtrup 1959) have established beyond doubt the presence of large stores of reserve DNA in the extranuclear region (cytoplasm). Quantitative estimations show that the amount varies in different species. Based on the DNA present in the spermatozoa, the DNA present in the cytoplasm would provide approximately for 3,900 to 25,000 diploid cells (Bieber et al. 1959, Løvtrup 1959).

The contradictory opinions of the above workers prompted the author to take up this present investigation to locate DNA and RNA in the growing oocytes of some freshwater fish by histochemical methods.

* The author is grateful to Dr. P. Govindan, Professor of Zoology, for suggesting the problem and guidance. Thanks are also due to Prof. J. Brachet and Dr. B. Scharrer for their valuable advice and critically reading the manuscript and to Mr. T. S. Balasubramanyan for his assistance in the preparation of this paper. The financial assistance provided by the Government of India by way of a Research scholarship is gratefully acknowledged.

Material and Methods

Notopterus notopterus (Pallas); *Ophicephalus striatus* Bloch; and *Tilapia mossambica* Peters (exotic) are three widely different types of freshwater teleosts, commonly occurring in South India. Fresh materials were collected from the nearby Veeranam lake and also from local ponds. Small bits of fresh ovaries, fixed in Carnoy, Zenker and Serra's fluid were used in the present investigation. Staining methods such as the Feulgen and toluidine blue-methyl green technique of Korson (Gurr 1958) were employed. To verify the results obtained, the toluidine blue technique, described by Bonhag (1955) and Pelling (1959) was also used. Of the three procedures followed the toluidine blue-methyl green technique proved more satisfactory than the rest. With this stain RNA stained blue and shades of blue whereas DNA stained green. Methyl green was found to be very specific for staining DNA by other workers also (Brachet 1953, Kurnick 1952, 1955; Walker and Richards 1959).

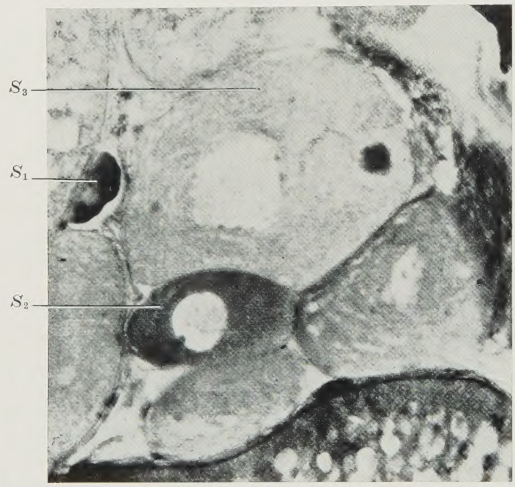


Fig. 1. Section of ovary of *Ophicephalus striatus* showing the different stages of early oocytes. *S 1*, *S 2*, *S 3* — stages of early oocytes. Perchloric acid treated for 24 hours and stained in toluidine blue- methyl green. × ca. 350

Fig. 2. Section of advanced oocyte (vacuolization stage) showing the perinuclear area of cytoplasm (*P.N.C.*). × ca. 130

Control sections were treated with 10% cold perchloric acid at 5°C (Pearse 1954) for different lengths of time. The major part of the RNA was removed after treatment with perchloric acid for 18 to 24 hours, and at this period DNA was not affected by the extractant. Treatment with perchloric acid at this temperature for 72 hours, however, removed DNA as well as RNA completely. After extraction of RNA alone, DNA stood out markedly stained by methyl green. Toluidine blue at pH 4.1 and at a temperature of 45°C (Pelling 1959) stained both RNA and DNA. The selectivity of the stain in this study appeared, however, to be poor.

Observations

Ovaries of the fishes present oocytes from the very early immature stage to the fully mature eggs. The early oocytes themselves present different grades of growth, ranging from the earliest condition wherein the germinal vesicle presents just the traces of the appearance of lampbrush chromosomes, to the stage where vacuolization in the cytoplasm occurs with the exception of the perinuclear area.

At the earliest stage the oocyte is fairly oblong in shape, with an almost centrally placed germinal vesicle, which fills up the major part of the cytoplasm

of the oocyte. The oocyte at this stage measures about 16 μ in diameter, and the cytoplasm is homogeneously dense. At this stage the cytoplasm when stained with toluidine blue-methyl green, takes up a moderately deep green stain. However, the entire peripheral part of the cell appears deep blue masking the methyl green stain. When this superficially located toluidine blue positive RNA is removed by extraction with perchloric acid, the entire cytoplasm stains green, suggesting the presence of DNA. In addition a faintly positive Feulgen reaction was also observed in the cytoplasm. Control sections (unhydrolyzed), however, showed no such staining. This apparent faint nature of Feulgen reaction may, as pointed out by Bloch (1958), be attributed perhaps to the differently depolymerised state of the cytoplasmic DNA (S_1, Fig. 1). Histochemical tests were also performed to study the distribution of mucus, since this is also stained by methyl green (suggested by Brachet — personal communication). Bauer-Feulgen and periodic acid Schiff staining failed to give a positive reaction in the cytoplasm of the early oocytes, thereby indicating the absence of mucus. Hence the staining obtained with methyl green is due to DNA only.

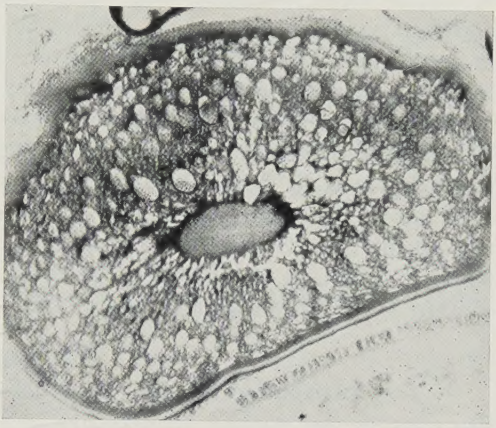


Fig. 3. Section of more advanced oocyte showing vacuolization. × ca. 120

The next stage of the oocyte is marked by its growth to a considerable size (67 μ). The germinal vesicle is much expanded with its lampbrush chromosomes fully formed. The cytoplasm still possesses the homogeneous consistency and shows very high affinity for toluidine blue, almost completely masking the methyl green stain which is somewhat less intense than that of stage 1. Even the control sections in which RNA is removed show such less intense staining by methyl green (S_2, Fig. 1).

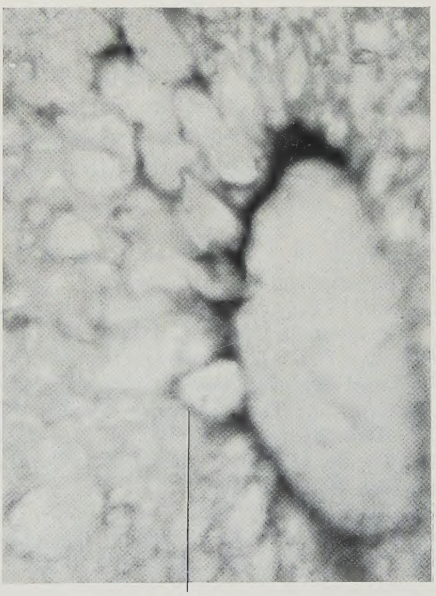


Fig. 4. A portion of the oocyte shown in Fig. 3, magnified to show the cytoplasmic strands (*C.S.*). × ca. 360

The oocyte at its next stage (S_3, Fig. 1) is about 116 μ in diameter with an almost centrally located germinal vesicle containing well formed lampbrush chromosomes and many prenucleolar bodies. In this stage the cytoplasm of the

oocyte stains less intensely with toluidine blue. This is partly due to the increase in the volume of the oocyte. Similar results have been obtained in the insects also (Bonhag 1955). Likewise the intensity of the green colour in the control sections has become very much diffused.

In the more advanced stage (Figs. 2 and 3) vacuolization appears at the peripheral limits of the oocyte and extends gradually towards the nuclear membrane, leaving free, however, the perinuclear area of cytoplasm. At this stage RNA stained with toluidine blue is seen clearly in the perinuclear area and in the cytoplasmic strands in between the vacuoles (Fig. 4). Even in this stage a homogeneous but faint green colour (DNA) in the perinuclear area and cytoplasmic strands is detectable. Such a week staining is observed with Feulgen stain also. The nucleoplasm shows a uniform faint green colouration. Since this green colour is eliminated in sections treated with cold perchloric acid for 48 to 72 hours, it may be suggested that the nucleoplasm at this stage may contain a certain amount of DNA.

Summary

1. The distribution of ribo- and desoxyribo-nucleic acids in the growing fish oocytes was studied histochemically.

2. Very early oocytes showed the presence of an appreciable amount of extranuclear (cytoplasmic) store of DNA.

3. This reserve DNA, in normal sections was masked by the peripherally located toluidine blue positive RNA. On removal of this RNA, by treating the sections with 10% cold perchloric acid (at 5°C) for 18 to 24 hours, the reserve DNA was stained well by methyl green.

4. A progressive decrease (apparent) in the staining intensity for both DNA and RNA was observed as the oocytes increased in size.

References

Bieber, S., J. A. Spence and G. H. Hitchings: Nucleic acids and their derivatives in the development of *Rana pipiens*. Exp. Cell Res. **16**, 202—214 (1959).

Bloch, D. P.: Changes in the Desoxyribonucleoprotein complex during the cell cycle. In: Frontiers in Cytology, p. 113—166. New Haven: Yale University Press 1958.

Bonhag, P. F.: Histochemical studies of the ovarian nurse tissues and oocytes of the milkweed bug' *Onchopeltus faciatus*. J. Morph. **96**, 381—440 (1955).

Brachet, J.: The metabolism of nucleic acids during embryonic development. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **12**, 18—27 (1947).

— The use of basic dyes and RNAse for the cytochemical detection of RNA. Quart. J. micr. Sci. **94**, 1—10 (1953).

— Biochemical Cytology, p. 227—228. New York: Academic Press 1957.

Chayen, J., and K. P. Norris: Cytoplasmic localization of nucleic acids in plant cells. Nature (Lond.) **171**, 472—473 (1953).

Finnamore, F. J., and E. Volkin: Nucleotide and nucleic acid metabolism in developing amphibian embryos. Exp. Cell Res. **15**, 405—411 (1958).

Grant, P.: The synthesis of DNA during early embryonic development of *Rana pipiens*. J. cell. comp. Physiol. **52**, 227—247 (1958).

Gurr, E.: Methods in Analytical Histology and Histochemistry, p. 158—159. London: Leonard Hill 1958.

Hoff-Jørgensen, E.: Deoxyribonucleic acid in some gametes and embryos. In: The Colston Papers: Proc. 7th Symp. Colston Res. Soc. **7**, 79—88 (1954).

—, and E. Zeuthen: Evidence of cytoplasmic deoxyribosides in the frog's egg. Nature (Lond.) **169**, 245—246 (1952).

Kurnick, N. B.: The basis for the specificity of methyl green staining. Exp. Cell Res. **3**, 649—652 (1952).

— Histochemistry of Nucleic acids. Int. Rev. Cytol. **4**, 221—268 (1955).

Løvtrup, S.: Synthesis of DNA during amphibian embryogenesis. J. exp. Zool. **41**, 545—570 (1959).

Needham, J., and D. Needham: On phosphorus metabolism in embryonic life. I. Invertebrate eggs. Brit. J. exp. Biol. **7**, 317—348 (1930).

Pearse, A. G. E.: Histochemistry: Theoretical and Applied, p. 119—120. London: Churchill 1954.

Pelling, G.: Chromosomal synthesis of ribonucleic acid as shown by incorporation of Uridine labelled with Tritium. Nature (Lond.) **184**, Suppl. **9**, 655—656 (1959).

Sze, L. C.: Changes in the amount of desoxyribonucleic acid in the development of *Rana pipiens*. J. exp. Zool. **122**, 577—601 (1953).

Walker, P. M. B., and B. M. Richards: Quantitative microscopical techniques for single cells. In: The Cell, I, p. 91—160. New York: Academic Press 1959.

V. K. Venugopalan,
Department of Zoology, Annamalai University, Annamalainagar (India)

Zeitschrift für Zellforschung 55, 622—634 (1961)

Instituto de Investigacion de Ciencias Biologicas

ELECTRON MICROSCOPE STUDY OF THE DEVELOPING CHICK EMBRYO HEART

By

Salo Wainrach* and J. Roberto Sotelo

With 9 Figures in the Text

(Received July 3, 1961)

During the last ten years a number of authors have studied the fine structure of the adult heart (Beams et al., 1949; van Breemen 1953; Weinstein 1954; Sjoestrand and Anderson 1954; Hodge et al. 1954; Price et al. 1955; Kisch 1954, 1956; Muir 1957; Moore and Ruska 1957; Porter and Palade 1957; Edwards and Challice 1958). Few references can be found instead on the ultrastructure of the heart at the development period. Hibbs (1956), for instance, studied the cardiac muscle of the developing chick embryo with the electron microscope. He observed at the 36 hrs. incubation stage the first myofibrillar bundles crossed by narrow Z bands and at 72 hrs. fully striated myofibrils of adult appearance. It should be noted that the first heart beats were reported as visible even before the formerly mentioned stage.

Lindner (1957), also studied the heart of the chick embryo at the 40 hrs. stage (11 somites); he observed that the myofibrils present a morphologic relationship with the sarcoplasmic reticulum. Muir (1957), studying rabbit embryo hearts with the electron microscope observed the existence of early intercalated discs at places where myofilament bundles of neighbour cells meet. Lanzavecchia (1957) who studied the fine structure of the heart of 72 to 120 hrs. chick embryos remarked that the sarcoplasmic reticulum was not yet fully developed at this period.

This paper has been intended to describe some relevant aspects observed in the myoblasts of the chick embryo heart at the early period referred to below. The description will be therefore limited to the myofibrillar disposition in the myoblasts and to some details regarding the relationship between the myoblast limiting membranes. The possible significance of the facts found will be finally discussed.

Material and Methods

The heart of the chick embryos of different age was used for this study. The youngest hearts studied corresponded to 29 hrs. old embryos, the oldest to 288 old ones. Fixation was performed by dropping the osmium tetroxide solution (1% osmium tetroxide in Periston, Trujillo-Cenóz 1957) on the embryo "in toto". The hearts were removed few minutes afterwards and bathed in the same solution. The period of fixation varied from 25 minutes to one hour. The tiny hearts of the youngest embryos were not fragmented but hearts of more developed embryos were sectioned into small pieces. Embedding was carried out, as usual,

* Fellow working under a local fellowship program supported by Grant No. 56030 of The Rockefeller Foundation.

Fig. 1. Panoramic view partially showing two myoblasts. The cells show large dense granulated areas intermixed with smaller agranulated ones. Cell (*A*) does not show any indications that myofilaments have already developed while cell (*B*) shows in three points: *F*, F_1, F_2, small cross sectioned bundles. *M* mitochondria, *SR* sarcoplasmic reticulum, *a* agranulated areas, *nl* nucleolus, *Cm* cell membrane, *N* nucleus. 40 hrs. old chick embryo. 16000 ×

in n-butyl-methacrylate. Sections were cut with a Porter-Blum microtome, and observed with an RCA EMU 2 C-model electron microscope.

Observations

Myoblasts and myofibrils. Young myoblasts are seen in general as polygonal cells with abundant cytoplasm. The latter shows, at the electron microscope, regions charged with numerous dense free particles (R.N.A.) but there are also

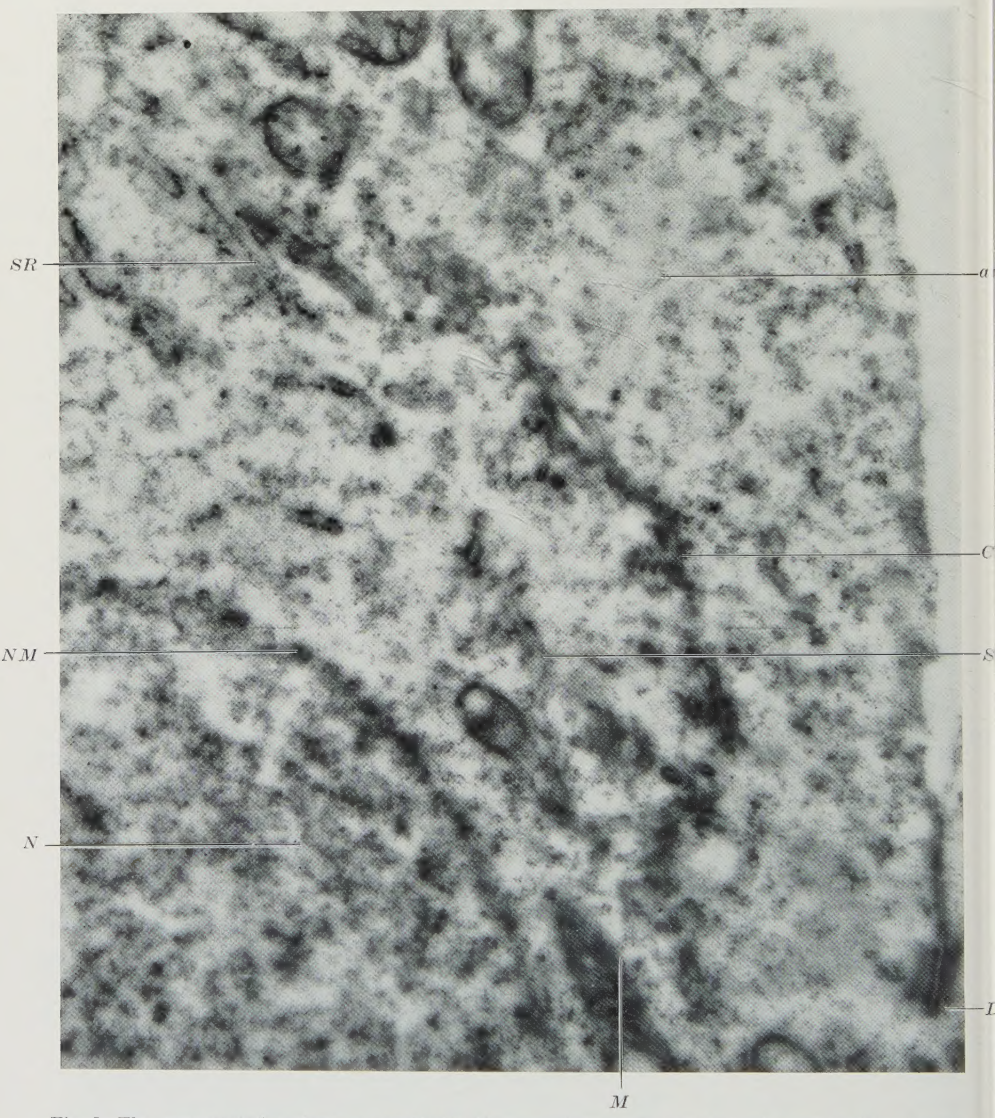


Fig. 2. The agranulated regions (*a*) signaled in the preceding picture can be better seen in this electron-micrograph of a myoblast from a chick embryo of 29 hrs. A number of obliquely cut canalicular structures (*C*) can be seen describing a wide curb from the top left angle of the picture to its bottom. At *D* a desmosome is seen. *SR* sarcoplasmic reticulum, *N* nucleus, *M* mitochondrium *NM* nuclear membrane. 28000 ×

regions where the fine graininess of the matrix is only seen (Fig. 1 and 2). This cytoplasmic feature is frequently observed in the youngest stage and less frequently as development progresses. At advanced stages only few cells of this kind

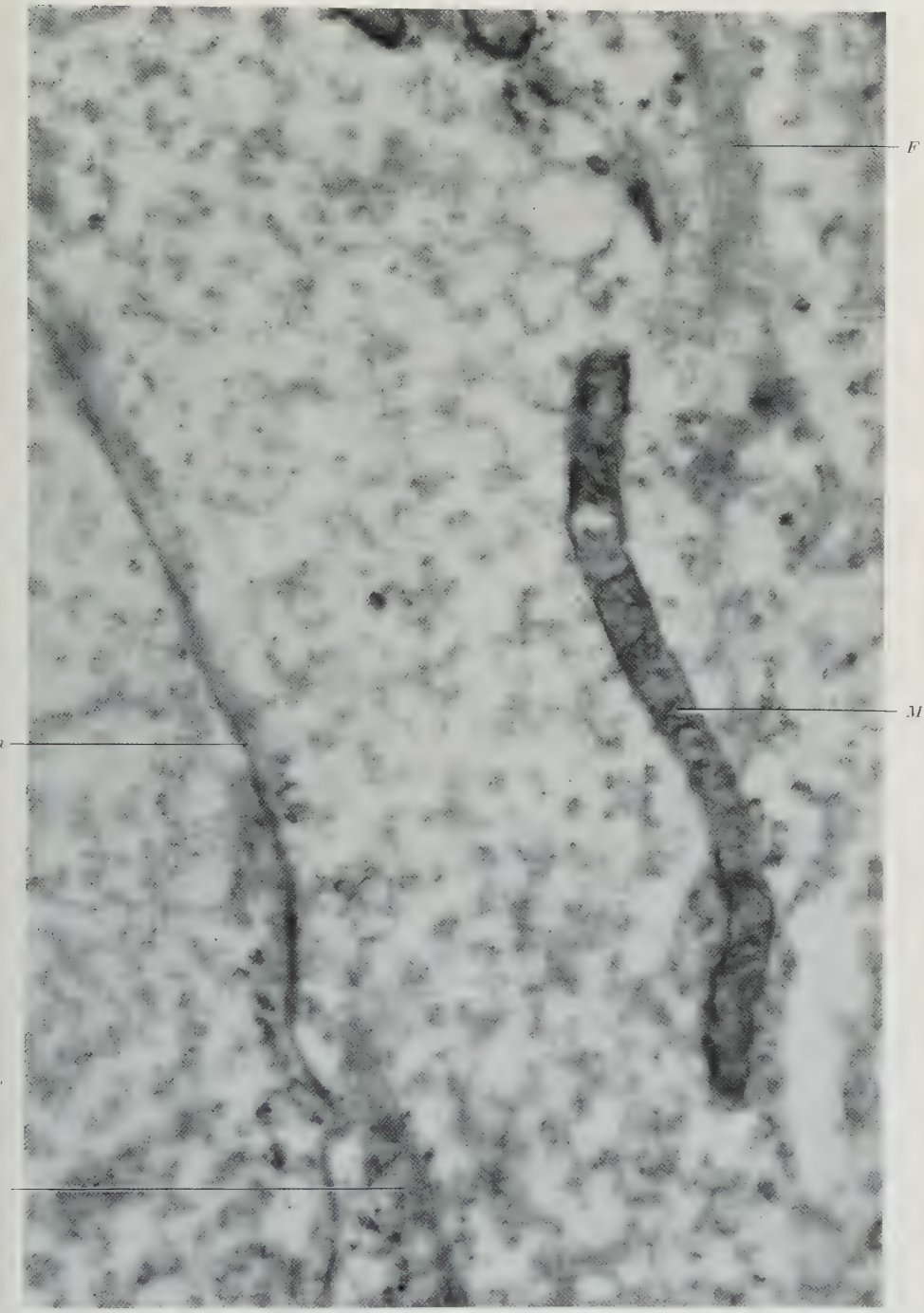


Fig. 3. Part of a large cell with a very clear cytoplasm. In spite of the elongated appearance which is particularly visible in the picture, only two bundles of myofilaments F and F_1 join the cell membrane and run along it. No cross striation is apparent in any of the bundles. This cell is one of a group found among highly developed myocells at 111 hrs. *Cm* cell membrane, *M* mitochondria. 42000 ×

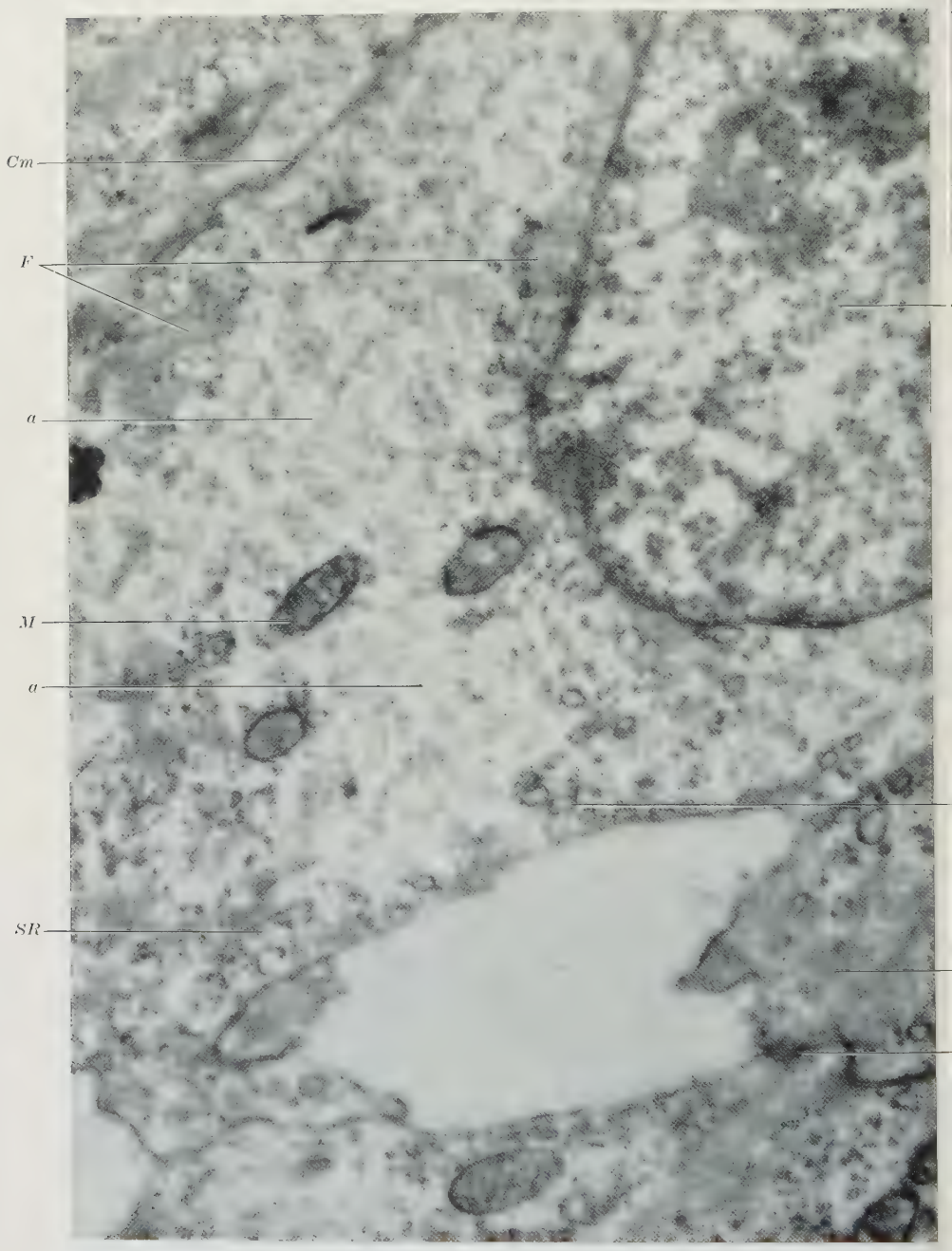


Fig. 4. The cells show: extense agranulated areas (*a*) mostly devoid of any structure; bundles of not striated myofilaments (*F*), part of these run along the boundary of the cells and part along the nucleus; an intercalated disc (*D*) is seen interposed in the place where fascicles of myofilaments of neighbour cells meet. The difference in structure between the desmosomes shown in the preceding picture and the early intercalated disc shown here should be noted. *Cm* cell membrane, *F* myofilaments, *SR* sarcoplasmic reticulum, *M* mitochondria, *N* nucleus. 111 hrs. old chick embryo. 28000 ×

are found scattered among the developed ones. It was nevertheless observed, that cells of this kind form more or less loose groups among the packed elongated myocells. It could be suggested that these undifferentiated cells may form part, lately of the specific system.

Myoblasts divide by mitosis as other embryonic cell types do, and mitotic cells are readily observed at very young stages. The cytoplasm of dividing cells does not show any sign of myofibrillar differentiation which is however observed in their neighbour cells.

The first slender myofilaments were observed at 29 hrs. and they are already forming thin bundles at 33 hrs. At this stage the earliest bands that can be noticed are seen as ill defined cross lines, slightly denser than the myofilaments themselves.

Well marked Z-bands can be depicted at later stages (45 hrs. 14 somites). A new disposition related to the Z bands was found at 55 hrs. (26—28 somites). Already at this age, many cells show thin myofibrillar bundles branching off, at several angles, from any of the Z-bands of a wider myofibrillar bundle, but the disposition repeats itself at later stages (80 hrs.). This kind of myofibrillar arrangement was found to be, in some cases, particularly distinctive because many myoblasts show the Z-bands as a center from which several bundles of myofilaments arise. The disposition conveys the idea that new myofibrils may grow at the place of anyone of the bands of older bundles. It was found convenient for the purpose of description to nominate Z-centers, the Z-bands showing myofilaments arising in a direction differing from that of the main bundle.

The following types of Z-centers were found: 1. single bundles emerging perpendicularly from the main one (Fig. 5 and 6); 2. three or more bundles radial-like arising from only one Z-band (Fig. 7); 3. three Z-bands connected between them in such a way that the three bundles involved form a triangle (Fig. 8).

In some cases one or more of the bundles arising from a Z-center could be seen running towards the cell boundary where they become connected with the myofilaments of the neighbour cells. Each of these connections represents an early intercalated disc. Z-centers are still distinguishable at the 180 hrs. stage, but at this time the myoblasts have considerably elongated and the number and width of their myofibrillar bundles have increased. It seems that the cell elongation and the packing of many bundles inside the cell are the factors contributing to mask this kind of interrelation between bundles.

The organization of the sarcoplasmic reticulum parallels the organization of the myofilaments, the first indication of contiguous association between both cell components appearing at about 29 hrs. The association starts apparently at the level of the Z-bands where small round or slightly elongated profiles of canaliculi appear generally at both sides of the bundles. At later stages (about 45 hrs.) longitudinal profiles of canaliculi can also be observed and the association gradually comes to have the appearance described in the adult by several authors (Bennett and Porter 1953, Bennett 1956, Porter and Palade 1957).

Myoblast limiting membranes. Two structures are particularly distinctive in the myoblast membranes: desmosomes and intercalated discs. Both have been

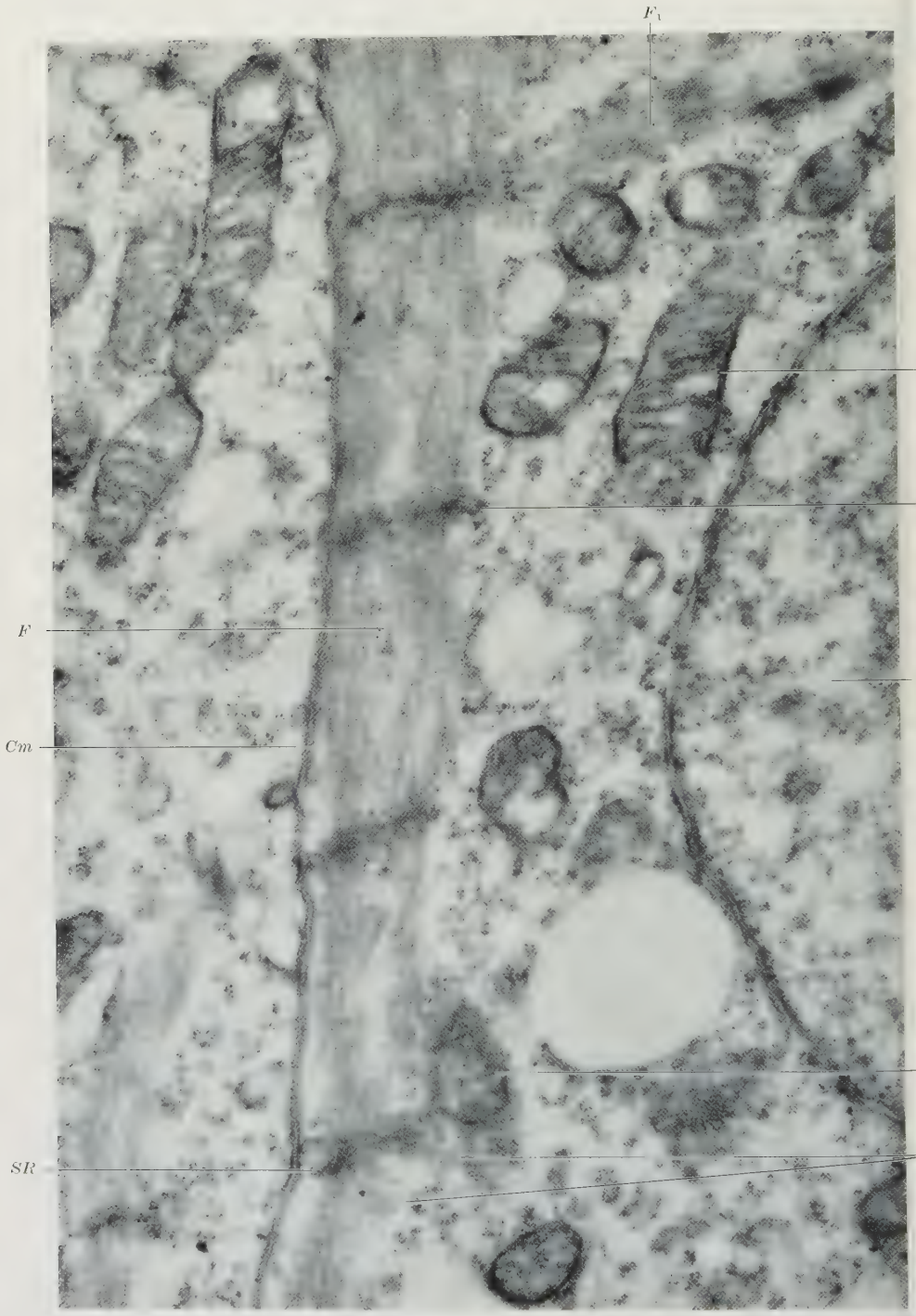


Fig. 5. A bundle of myofilaments (F_1) arises from the Z-band of a thicker one; F. A faint indication of a similar phenomenon is seen at F_2, but here the secondary branch seems to be cut off the section. Profiles of sarcoplasmic reticulum (SR) are seen in contact with Z-bands. Cm cell membrane, M mitochondria, N nucleus. 80 hrs. old chick embryo. 32000 ×

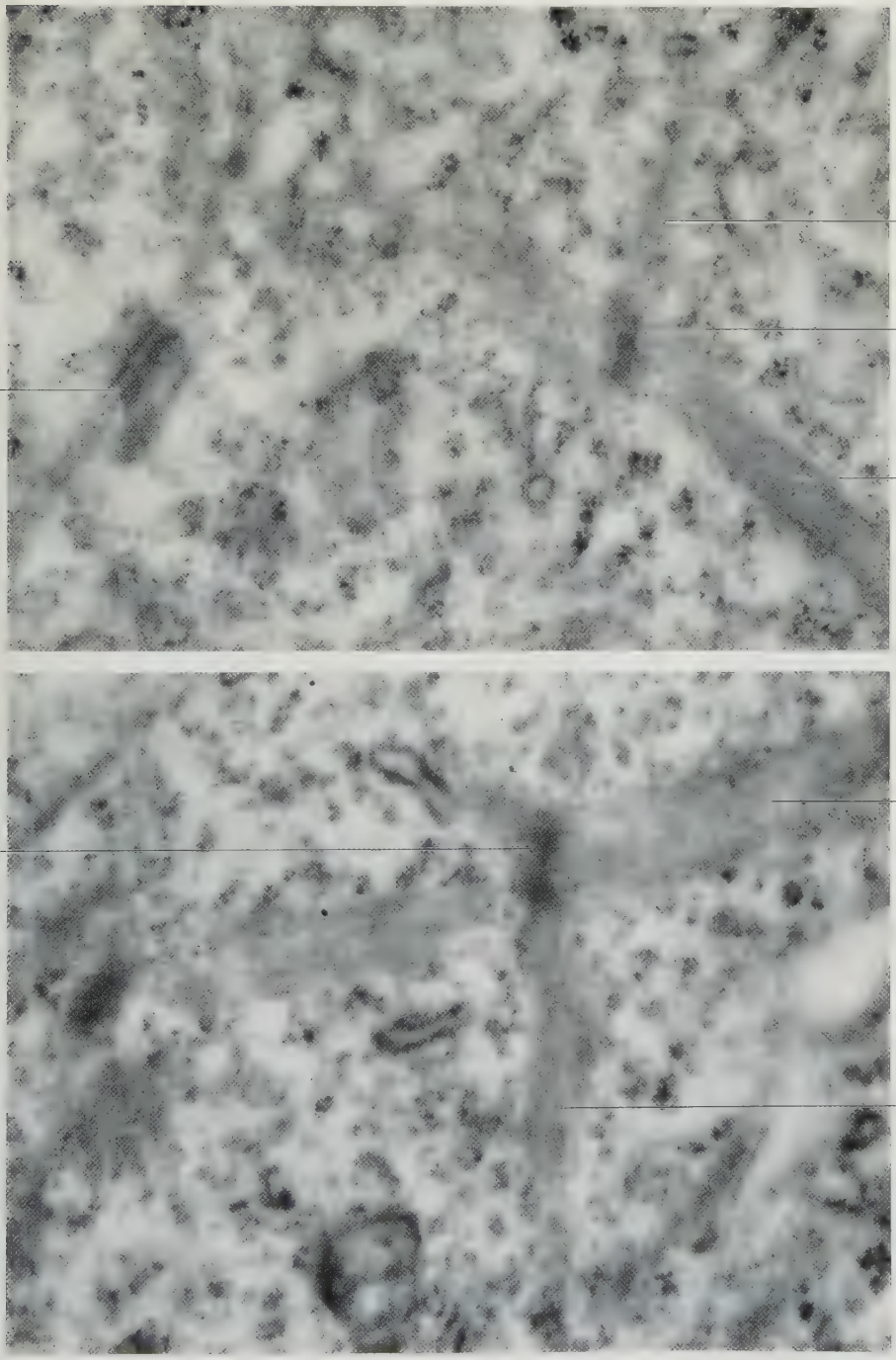


Fig. 6 and 7. Myofilaments (F, F_1,) branching off from the same Z-band (Z-center). Fig. 6 also shows a desmosome (D). 80 hrs. old chick embryo. Fig. 6: 42000 ×. Fig. 7: 24000 ×

studied with the electron microscope by several authors (Van Breemen 1953, Sjoestrand and Anderson 1954, Muir 1957) and were also observed during the course of this investigation. The main facts to report here on these structures of the cell membrane are: 1. desmosomes pre-exist to the development of myofilaments and seem to be independent from them as no myofilaments were ever seen connected to the desmosomes, 2. desmosomes and intercalated discs are found simultaneously in the same myoblast; 3. the limiting membrane shows only a narrow irregular line of dense granules at the place where an intercalated disc develops, and desmosomes appear as thick bands of dense material at the inner side of each limiting membrane.

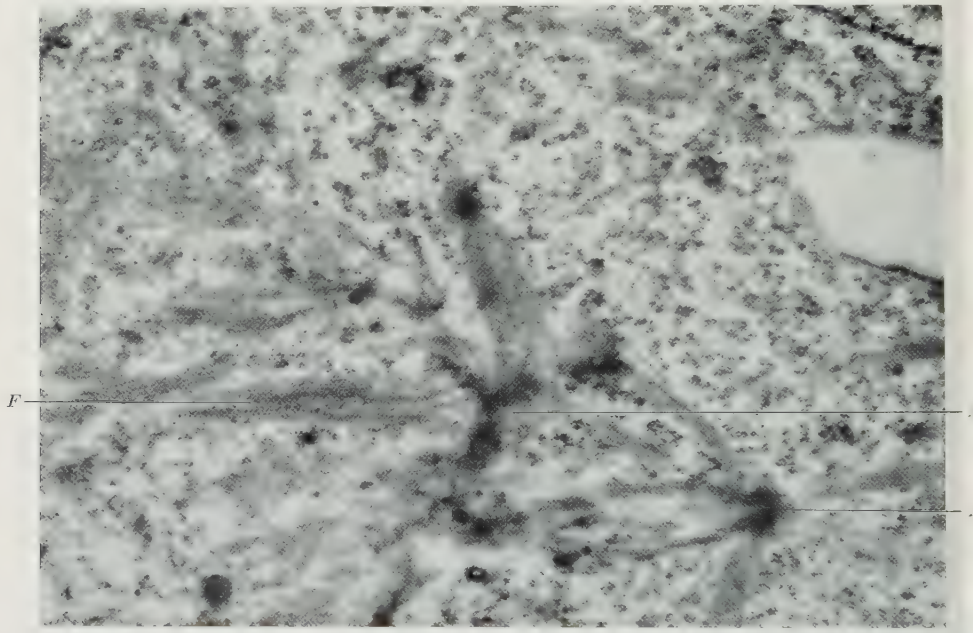


Fig. 8. This picture shows the intrincated way in which myofilaments (F) may be interconnected. Two centers Z_1 and Z_2 are clearly observed and from them several bundles arise radially. 80 hrs. old chick embryo. 20000 ×

Discussion

Heart automatism is considered to be, at least during the early period of development, purely myogenic, as no nervous structures were ever found before the age of 6 days (Lillie 1908, Hoff et al. 1939). The question thus arises: which of the components existing in young myoblasts is the one responsible for coordination and transmission of the contractil wave at the cellular level and at the early period of development?

The classic concept on myocardium structure, based of course on light microscopy, sustained that it is an extended syncytium containing packed bundles of myofibrils. The interchange of myofibrils between neighbour fibers was well described by Heidenhain (1911) and was for long considered as a proof of the syncytial nature of the tissue (Levi 1941).

This concept provided a general basis to explain coordinated contraction of the whole organ, but it is insufficient to explain the intimal aspects of the transmission of the contractil wave from bundle to bundle.

Embryologists (Patten and Kramer 1933, Goss 1937/38 and Goss 1940, Patten 1946) have observed that the first isolated beats occur in the chick embryo heart as early as the beginning of the 2nd day of incubation, and rhythmical contractions of the whole organ at about 36 hrs. On the other hand, electron microscope studies demonstrated that the first myofibrils appear as early as 29 hrs. and that intercalated discs develop shortly afterwards.

No definite evidences were found up to the present on the way myofilaments develop in the myoblast and one can speculate as to whether they come out from the undifferentiated cytoplasmic matrix, or their growth is depending on preexisting structures, for instance, desmosomes. These are very interesting structures because they are the first distinctive disposition that can be observed in the developing heart, to which an interconnecting role may be attributed.

Grimley and Edwards (1960) have recently demonstrated that in the heart myocells of the toad, desmosomes and Z-bands can be continuous and of similar nature. The authors postulate a formative relationship between both components; in addition they show that myofilaments may run in between. Considering desmosomes as precursors of intercalated discs they think that the latter are involved in the formation of new sarcomeres. Although the differentiation of the first myofilaments was not actually observed during the course of this investigation two facts were altogether evident: 1. intercalated discs develop independently of desmosomes and 2. myofilaments may grow multidirectionally from the material integrating Z-bands of older bundles (Z-centers).

It is pointless for us to discuss whether intercalated discs may or not give raise to new sarcomeres, because we could not see actually any factual indication supporting or denying this view.

The importance of the intercalated discs as intermediates in conduction of the contractil wave has been emphasized by the histochemical work of Bourne (1953) and by the electron microscope findings of several authors. We can impart now that intercellular connection between myofilaments is guaranteed by the mutual interdependence of different sarcomeres through Z-bands (Z-centers).

The Z-center interconnecting disposition is readily observed in the young embryo due to the fact that myofibrils are still separated by a fair amount of sarcoplasm and on account of the polygonal shape of the cells. It can be supposed that the feature is not lost in the adult but it does not appear visible on account of the parallelism and close packing of the bundles inside the cells.

The above paragraphs show that we do conceive the Z-center organization not as a mere developmental pattern, but as a system that may have a bearing on the physiology of conduction.

Recent theories on this matter (Bennett 1955, Porter and Palade 1957, Peachey and Porter 1959) have incriminated the endoplasmic (or sarcoplasmic) reticulum as a factor that may be involved in intracellular conduction, the main basis for such theories being the parallelism of architecture shown by both fibrillar and canalicular systems.

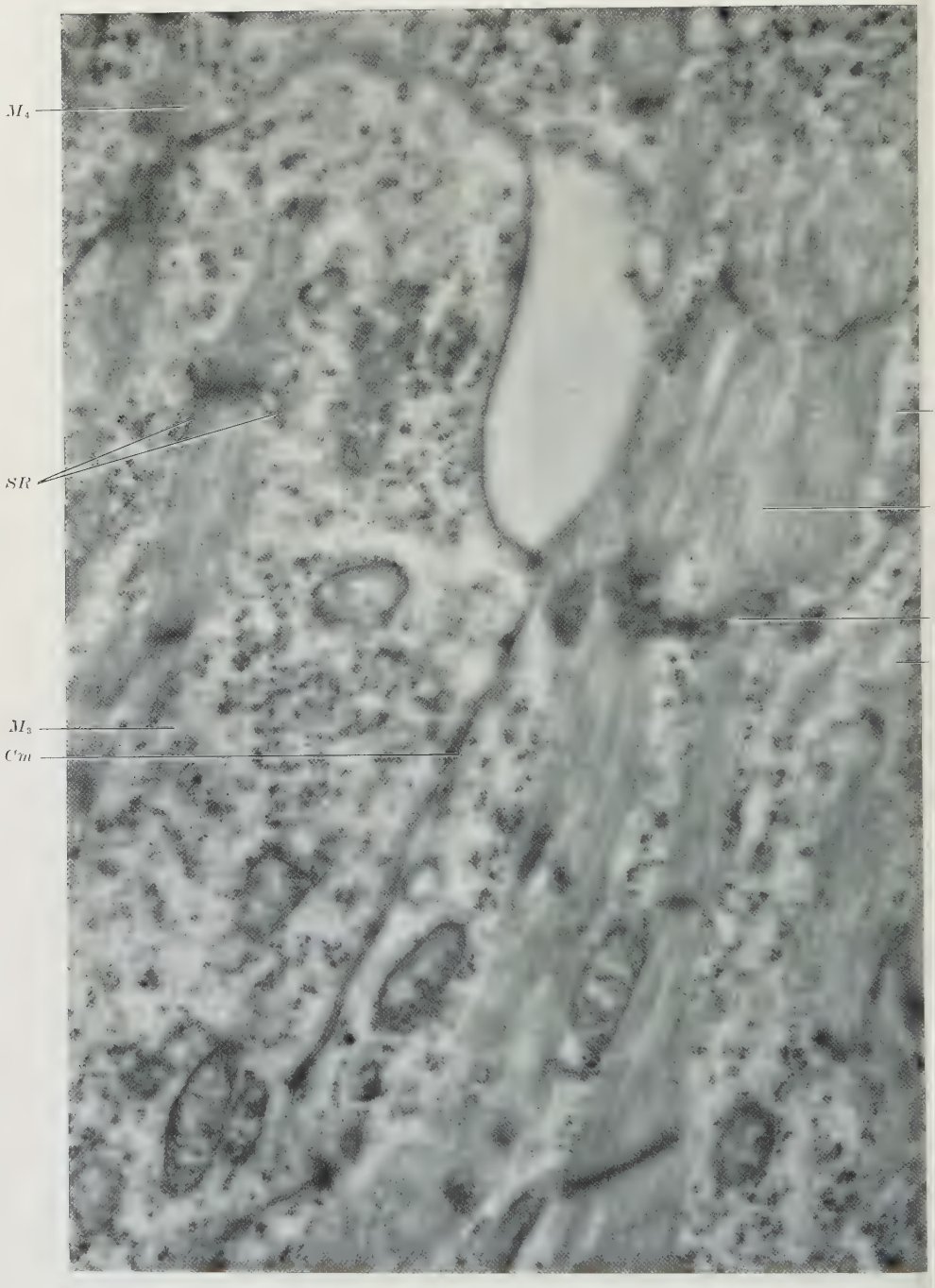


Fig. 9. Four myoblasts numbered M_1, M_2, M_3 and M_4 are seen. The separation between M_1 and M_2 is marked by an intercalated disc (I) which is still uncompletely formed. Observe that the intercalated disc is at mid-distance between the two first Z-bands at each side of the cell membrane. M_3 and M_4 show another intercalated disc. SR sarcoplasmic reticulum, Cm cell membrane. F myofilaments. 24000 ×

The observations made on developing heart myocells allow only to state that the association of contiguity between ER and myofibrils (profiles associated at the Z-band level, etc.) starts early and may be significant to the metabolic needs of the contractil material.

Summary

Myofibrillar differentiation in heart myocells of the chick embryo was studied with aid of the electronmicroscope. At early stages (29 hrs.) thin myofibrillar bundles are seen already differentiated in the cytoplasm of the myoblast and a few hours later cross striation can be depicted as ill-defined densities regularly spaced along the myofilaments.

At later stages it was seen that some myofibrillar bundles seem to arise from a Z-band belonging to a thicker bundle. This disposition was frequently seen but the number of bundles observed arising from a single Z-band is varied. Cases were found in which two or three bundles were interconnected by myofibrillar bridges. The disposition was nominated Z center and it is interpreted as favouring spreading of the contractil wave from bundle to bundle. Conduction of the contractil wave from cell to cell is insured through intercalated discs.

Desmosomes and intercalated discs were observed during the course of this study, but no relationship between both components of the cell membranes nor between desmosomes and myofilaments were found.

References

Beams, H. W., T. C. Evans, C. D. Janney and W. W. Baker: Electron microscope studies on the structure of cardiac muscle. Anat. Rec. **105**, 59—81 (1949).

Bennett, H. S.: Modern concepts of structure of striated muscle. Amer. J. phys. Med. **34**, 46 (1955).

— The sarcoplasmic reticulum of striped muscle. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, 171—174 (1959).

— and K. R. Porter: An electron microscope study of sectioned breast muscle of the domestic fowl. Amer. J. Anat. **93**, 61—106 (1953).

Bourne, G. H.: Enzymes of the intercalated discs of heart muscle fibres. Nature (Lond.) **172**, 588 (1953).

Breemen, V. L. van: Intercalated discs in heart muscle studied with the electron microscope. Anat. Rec. **117**, 49—55 (1953).

Edwards, G. A., and C. E. Challice: The fine structure of cardiac muscle cells of newborn and suckling mice. Exp. Cell Res. **15**, 247—250 (1958).

Goss, C. M.: The first contractions of the heart in rat embryos. Anat. Rec. **70**, 505—524 (1937/38).

— First contractions of the heart without cytological differentiation. Anat. Rec. **76**, 19—27 (1947).

Grimley, P. M., and G. A. Edwards: The ultrastructure of cardiac desmosomes in the toad and their relationship to the intercalated discs. J. biophys. biochem. Cytol. 8, 305—318 (1960).

Heidenhain, M.: Plasma und Zelle. Jena: Gustav Fischer 1911.

Hibbs, R. G.: Electron microscopy of developing cardiac muscle in chick embryos. Amer. J. Anat. **99**, 17—52 (1959).

Hodge, A. J., H. E. Huxley and D. Spiro: Electron microscope studies on ultrathin sections of muscle. J. exp. Med. **99**, 201—206 (1957).

Hoff, E. C., T. C. Kramer, D. Du Bois and B. M. Patten: The development of the electrocardiogram of the embryonic heart. Amer. Heart J. **17**, 470—488 (1939).

Kisch, B.: Studies in comparative electronmicroscopy of the heart. Exp. Med. Surg. **12**, 335—360 (1954).

— Electron microscopy of the atrium of the heart. I. Guinea pig. Exp. Med. Surg. **14**, 99—112 (1956).

Lanzavecchia, G.: Studio al microscopio elettronico sull'embriologia del miocardio di pollo. R.C. Ist. lomb. Sci. **92**, 207—212 (1957).

Levi, G.: Tratado de Histologia, 2nd ed. Barcelona: Ed. Labor 1941.

Lillie, F. R.: The development of the chick, p. 259. New York: Henry Holt & Co. 1908.

Lindner, E.: Submikroskopische Untersuchungen über die Herzentwicklung beim Hühnchen. Verh. Anat. Ges. 54. Versamml. Freiburg i. Br. 22.—25. Sept. 1957.

Moore, D. H., and H. Ruska: Electron microscope study of mammalian cardiac muscle cells. J. biophys. biochem. Cytol. **3**, 261—268 (1957).

Muir, A. R.: An electron microscope study of the intercalated disc in the heart of the rabbit. J. biophys. biochem Cytol. **3**, 193—202 (1957).

Patten, B. M.: The early embryology of the chick. Philadelphia-Toronto: The Blakiston Co. 1946.

Patten, B. M., and T. C. Kramer: The initiation of contraction in the embryonic chick heart. Amer. J. Anat. **53**, 349—375 (1933).

Peachey, L. D., and K. R. Porter: Intracellular impulse conduction in muscle cells. Science **120**, 721—722 (1959).

Porter, K. R., and G. E. Palade: Studies on the endoplasmic reticulum. J. biophys. biochem. Cytol. **3**, 269—300 (1957).

Price, K. C., J. M. Weiss, D. Hata and J. R. Smith: Experimental needle biopsy of the myocardium of dogs with particular reference to histologic study by electron microscopy. J. exp. Med. **101**, 687—694 (1955).

Sjoestrand, F. S., and E. Anderson: Electron microscopy of the intercalated discs of cardiac muscle tissue. Experientia (Basel) **10**, 369—370 (1954).

Trujillo-Cenóz, O.: Electron microscope study of the rabbit gustatory bud. Z. Zellforsch. **46**, 272—280 (1957).

Weinstein, H. J.: An electron microscope study of cardiac muscle. Exp. Cell Res. **7**, 130—146 (1954).

Dr. Roberto Sotelo, Instituto de Investigacion de Ciencias Biologicas, Dept. of Cell Ultrastructure, Montevideo/Uruguay, Av. Italia 3318

Zeitschrift für Zellforschung 55, 635—648 (1961)

Department of Anatomy M. H. Knisely, Ph. D., Chairman
Medical College of South Carolina, Charleston, South Carolina

HISTOLOGIC STUDIES ON THE NEUROHYPOPHYSIS OF THE LIVING FROG* **

By
W. Curtis Worthington, Jr., June R. Shealy and Jane L. Blakely

With 6 Figures in the Text

(Received July 17th, 1961)

Introduction

The evolution of the study of neuroendocrine mechanisms has involved as a major component studies of the histologic structure of the neurohypophysis. The neurosecretory theory, which has emerged from the work of Scharrer and Scharrer, Bargmann (see E. Scharrer 1959, B. Scharrer 1959, Bargmann 1949, and the Second International Symposium on Neurosecretion, 1958) and many others (e. g. Rothballer 1953, Leveque 1953, Palay 1957, Green and van Breemen 1955, Dawson 1953) has been based primarily on physiological interpretation of histologic material. Most of this large body of work has been carried out by fixed tissue techniques (Gomori's chrome-alum hematoxylin or the aldehyde fuchsin technique which stain neurosecretory material selectively, but not specifically) and to a lesser extent by electron microscopy. Such material permits observations of patterns in space but not of processes in time.

The techniques for the study of living tissue maintained in a condition which is as near to normal as possible have been applied to few, if any, of the many problems which have grown out of the neurosecretory concept.

In the course of a survey of the vascular patterns of the living frog pituitary, it became apparent that with some comparatively minor modifications of the operative procedure and a minimum of specialized equiment, it might be possible to observe parts of the living intact neurohypophysis in *Rana pipiens* and other amphibia at comparatively high magnifications, and thus study the structure of the neurohypophysis in a state undefiled by fixatives. Three dimensional spatial relationships could be observed without resorting to reconstructions, and moment to moment changes in structure could be observed continuously.

Amphibia have been used for some physiological studies of the pituitary and surrounding structures in living animals in the past. The most notable of these studies are those of Houssay, Biasotti and Sammartino (1935), Houssay (1949) and Green (1947). These studies, however, were not primarily concerned with the histologic features of the organ at high magnification.

The purposes of the investigations which this paper introduces include a search for visibly detectable manifestations of neurosecretory processes in the

* Supported by a Grant from the Commonwealth Fund and United States Public Health Service Grants H-4176 and HTS-5340.

** Presented in part, at the VIII. Microcirculatory Conference (Dr. John Irwin, Chairman), International Anatomical Congress, New York, April, 1960.

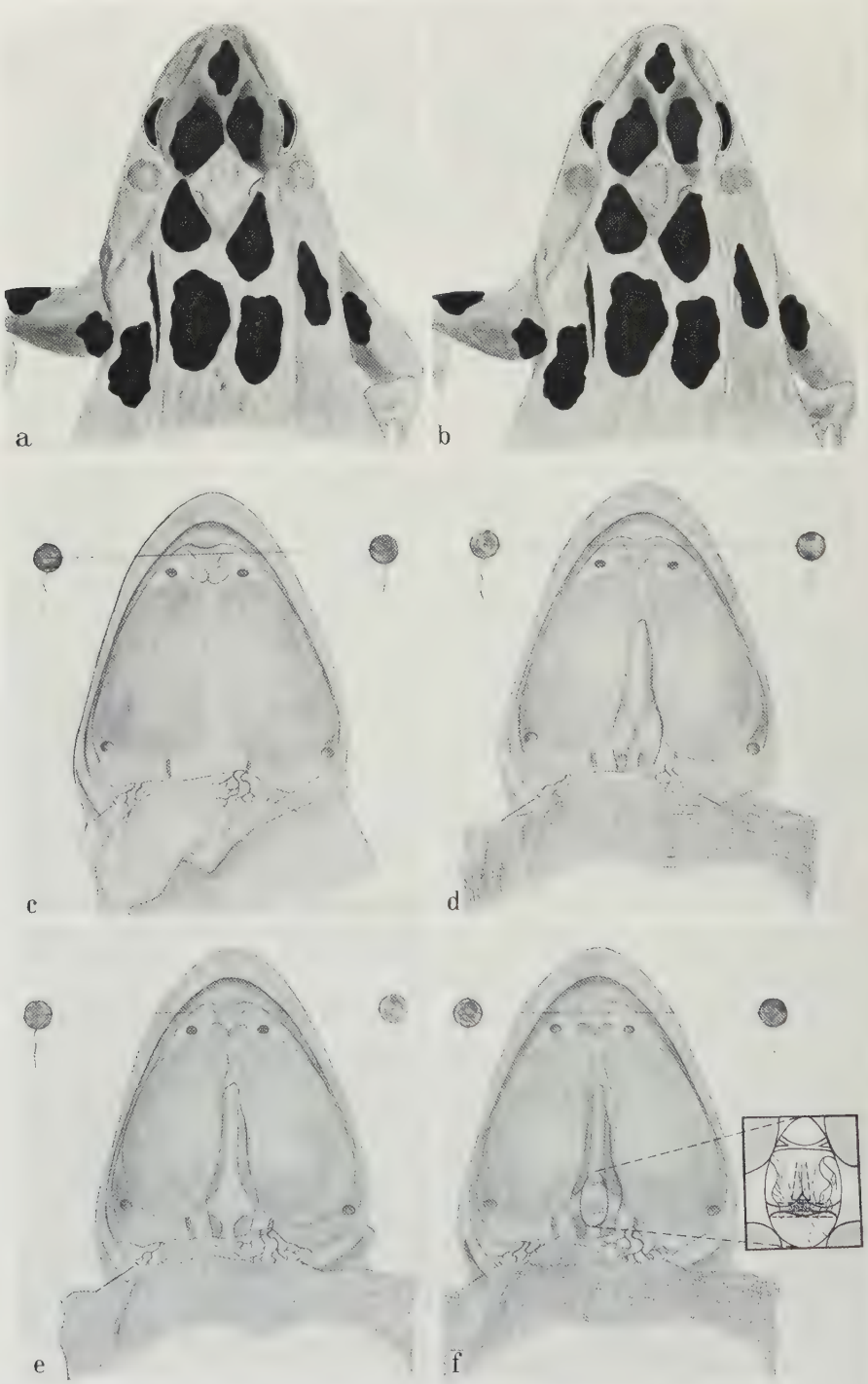


Fig. 1a—f. Stages in the operative preparation of frogs for microscopic examination of the infundibular region in vivo. (a) and (b): partial exposure of the dorsal surface of the brain for the transmission of light; (c), (d), (e), and (f): exposure of the ventral surface of the brain through the roof of the mouth for microscopic examination

region of the median eminence and infundibulum, the histological description of the anterior lobe, median eminence, and infundibular region in the *living animal*, and a description of the vascularization of the pituitary and infundibular region of living *Rana pipiens*. These aims are directed toward a more complete understanding of the neurosecretory processes and their relationships to variations in blood flow in the region.

The following account consists of a morphological survey at high magnification of the infundibular region in living *Rana pipiens* with an intact circulation and early reports of some apparent functional changes, together with a method for transillumination and high magnification study in the living animal.

Material and Methods

Over 200 male and female leopard frogs *(Rana pipiens)* were used in this study. In the initial stages of our work, they were obtained from several commercial sources, but for the past year we have purchased our animals from Steinhilber, Inc., Oshkosh, Wisconsin. This supplier ships frogs collected in his own area. They are shipped from freshly caught supplies in the spring, summer and early fall, and from outdoor pens supplied with running artesian well water during the winter. In addition, it is now our practice to have our frogs shipped in at the beginning of each week to avoid keeping animals in the laboratory for extended periods of time.

In order to expose the region of the infundibulum, the anterior pituitary, and portions of the hypothalamus in the frog, the animals are anesthetized with approximately 0.01 cc of 6 mg/cc solution of Nembutal per gram of body weight injected into the dorsal lymph sac. Some earlier observations were made with the injection of approximately 0.5 cc of 25% urethane into the dorsal lymph sac and a recent innovation has been the immobilization of the frog with curare (approximately 0.6 mg injected into the dorsal lymph sac) and operating under local (procaine) anesthesia. The latter method eliminates the initial circulatory depression seen with the other two agents, and the over-all circulatory condition of the field of study is better. Some of the variable structures described below are seen more consistently using this form of immobilization.

The operative preparation of the animals is done in two parts. The first is to remove the tissue from the top of the head to permit light to pass through. The second is to expose a portion of the ventral surface of the brain onto which the lens of a microscope can be focused. This is done through the roof of the mouth. A diamond-shaped piece of skin is removed from the dorsal aspect of the head in the midline from an imaginary transverse line placed between the orbits to a point between the anterior limits of the longissimus dorsi muscles (Fig. 1a). A window is placed in the dorsum of the skull by burring away the fronto-parietal bones in the midline with a small dental burr. Care is taken to leave a very thin translucent and almost transparent cartilaginous plate so that the defect will transmit light effectively in the absence of a physical opening into the brain case (Fig. 1b).

The frog is then placed on its back, and the lower jaw opened and retracted posteriorly, taking care to inflict as little injury as possible (Fig. 1c). The mucous membrane covering the roof of the mouth is incised in the midline. The margins of the incision in the mucous membrane are allowed to retract and there is revealed beneath it the "dagger-shaped" parasphenoid bone. See Figs. 1d and 1e. The "blade" of the dagger forms much the larger part of this bone and is directed anteriorly. A second opening in the skull is made in the region of the junction of the "blade" and "hilt" of the dagger in a manner similar to that which has been used extensively by others for hypophysectomy. This oval-shaped defect is made with a dental burr and involves part of the transverse processes of the parasphenoid. The defect is extended as a triangular area anteriorly along the longitudinal portion of the parasphenoid bone. Again, care is taken not to enter the cranial cavity with the dental burr. A thin cartilaginous plate (made as thin as possible without actually entering the cranial cavity) is left in place over the anterior lobe of the pituitary, which may be seen posteriorly, and over the infundibular region (which forms the floor of the third ventricle) which may be seen more anteriorly.

The final stage of the preparation of these frogs for examination must be done with great care. It is very easy to tear small blood vessels which results in bleeding in the region, whereupon the preparation is useless. Although it is impossible to give explicit directions for an operative procedure which can be done successfully only with some practice, the procedure is, in general, done in the following manner. The ventral cartilaginous plate is cut around with a No. 11 Bard-Parker (lancet) blade at the margins of the defect, taking care not to injure the structures which lie beneath. The cartilaginous plate is elevated with a very small dental chisel and removed with jeweler's forceps. The dura mater may be cut through by the scalpel when the cartilage is cut and elevated. However, better results in removing the dura may be obtained by incising it separately and lifting it up with a pair of forceps. The finished preparation may be seen in Fig. 1f.

The area is kept bathed in amphibian Ringer's solution. The region is aspirated by suction and fresh amphibian Ringer's solution is flooded over it at fairly frequent intervals. The frog is then placed on a cork board in which a hole has been bored, and the translucent window in the dorsum of the skull is made to correspond with the hole in the board. The preparation is placed on the stage of an ordinary compound microscope equipped with a Bausch & Lomb variable focus condenser and specially designed water immersion lenses. These lenses have been modified from the Leitz ultropak objective to give a long and very thin mount. Magnifications of 500×, 700×, and 900× have been obtained with this equipment. A Reichert microscope lamp with a series of filters (including an infrared absorbing filter) is used for illumination and gives sufficient light for visual examination and some photography. The vital dyes neutral red and methylene blue were applied to the tissues under examination in a number of animals in this series in order to improve contrast and in an attempt to stain some of the histologic structures in the region. This was not done frequently because the application of the dyes always resulted in a lesser or greater degree of circulatory disturbance. After study *in vivo*, the brains of some of our living preparations were fixed in Bouin's fluid, embedded in paraffin, and serially sectioned in either the sagittal or horizontal plane. The sections were stained with chrome-alum hematoxylin phloxine using a technique supplied by Dr. T. F. Leveque.

Observations

I. Blood Vessels

Blood vessels of the infundibular region in *Rana pipiens* are similar in many respects to those described by Houssay, Biasotti and Sammartino (1935) in the living toad and Green (1947) in the living bullfrog *(Rana catesbiana)*. However, the descriptions cannot be applied exactly or in their entirety to *Rana pipiens*. A detailed account of these vessels will be the subject of a separate communication. One major part of the pituitary and hypothalamic vascular system, which is of significance as a landmark in our histologic studies and which may be of significance physiologically, is a set of very narrow, more or less parallel, straight capillaries which occur in a single plane and on each side of the midline of the infundibulum. The distribution of the vessels of the infundibular region in *Rana pipiens* is illustrated in Fig. 2. Hypophyseal arterial vessels pass from the region just behind the optic chiasma on either side in a gentle curve backward along the lateral borders of the infundibulum toward the median eminence. For convenience of description the locations of vessels receiving blood from these arteries, including those of the portal vessels and the anterior lobe sinusoids, are given in five zones.

Zone 1 includes an area in the midline and just on either side of the midline and marks the location of the set of straight capillaries mentioned above. These vessels will henceforth be referred to as the "parallel capillaries". They arise from arterioles from the hypophyseal arteries at a point somewhat behind the

optic chiasma; and while some of the arterial branches turn anteriorly toward the chiasma, some turn posteriorly to branch into or become the parallel capillaries which pass in the midline toward the primary capillary plexus of the median eminence. Zone 2 is the area between the parallel capillaries and the primary capillary plexus, which we have termed the "transition zone". Zone 3 is the area

Fig. 2. The distribution of the small blood vessels in the infundibular region in *Rana pipiens*. From anterior to posterior five zones may be identified on the basis of vascular pattern. Histologic features in the living animal are described in reference to these five zones. Zone *1*: zone of parallel capillaries. Zone *2*: transition zone. Zone *3*: zone of primary capillary plexus. Zone *4*: zone of portal trunks. Zone *5*: zone of anterior lobe sinusoids. Arteries, arterioles, capillaries, portal trunks, and sinusoids are black; hypothalamic veins stippled

of the median eminence and contains the principal primary capillary plexus of the hypophyseal portal system. Zone 4 is an area occupied primarily by the portal trunks. Zone 5 includes the ventral surface of the anterior lobe and is characterized by anterior lobe sinusoids.

The vessels in each of these zones are in direct connection with the vessels in the next. The arterioles and capillaries which contribute to the system, in addition to those which give origin to the parallel capillaries, are directed toward the capillary structures in the midline in a somewhat radial fashion. The details of this may be seen in Fig. 2.

While variation in blood flow in these vessels will be described in the separate communication mentioned above, it should be noted that many of the histologic

and cytologic observations given below were not seen in the absence of a normal blood flow.

II. Granular Materials

It is the tissues between the capillaries and other vessels in the first three zones and part of the fourth that we have subjected to detailed scrutiny in the hope of identifying structures in the living with those structures which may be

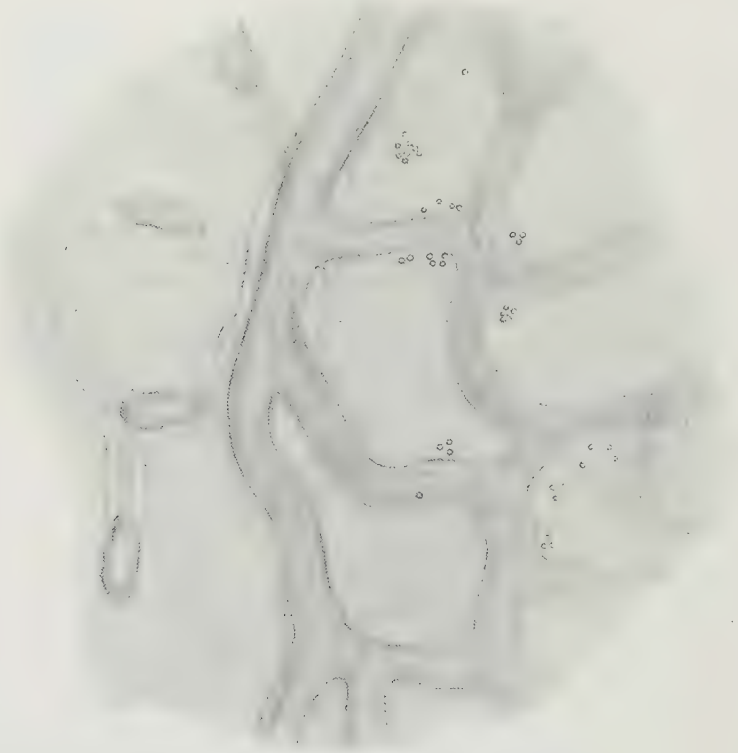


Fig. 3. Zone 3. Class I material: sharply outlined, small, round, granular structures. Class III material: stippled or lightly granular texture occurring in "islands" of tissue between capillaries. Initial magnification 900 ×

seen in fixed tissues. The major difficulty in this has been that the detail which may be seen in the living animal greatly exceeds that which may be seen in any sectioned material which we have so far examined. Several different morphologic types of particulate matter have been observed in Zones 1, 2, and 3 at magnification of 500 to 900 diameters. In addition, quite distinct fibers have been observed in this tissue on frequent occasions. Some of the structures described below have been photographed with a motion picture camera.

The first of these particles we have designated Class I for purposes of communicating in the laboratory. They are refractile oval or round granules, approximately 1—2 μ in diameter (occasional granules may be larger or smaller), and usually occur immediately adjacent to capillaries (Fig. 3). Only one or two of these granules may be seen within a cell, or the cytoplasm may be full of them.

Frequently the granules seem to be in the extracellular spaces and if they are within the cytoplasm of cells, cell borders or nuclei cannot be identified. These cells and granules are seen most frequently at a very superficial level of focus on the surface of the infundibulum.

On occasion some of the granule-containing cells have been studied very closely for long periods of time and have been found to be motile, moving about

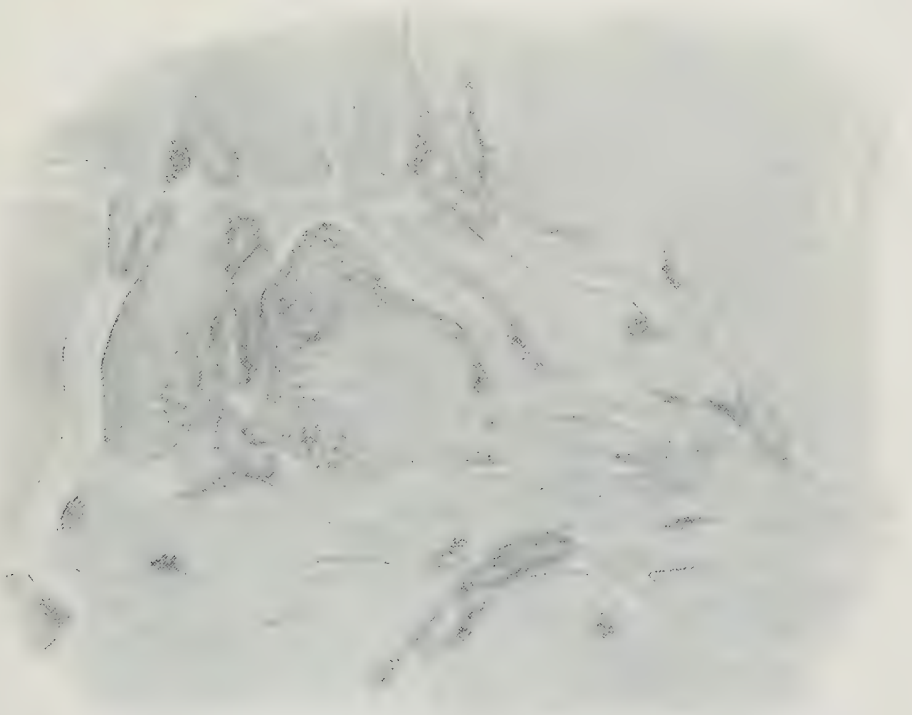


Fig. 4. Zone 3. Class II material: dark, granular material at the borders of capillaries and in tissue "islands". Class III material: light stippled texture of tissue in "islands" between capillaries. Initial magnification 900 ×

200 μ in about 30 minutes with a very slow ameboid motion. In most preparations, however, no motion has been detected during careful observation.

The second type of particulate matter which has been observed (Class II) is seen in "islands" of tissue between the primary capillaries (Fig. 4). This is a coarse, irregular granular material which usually appears dark under the conditions of the experiment. This material may be heavily concentrated along the borders of the capillaries with much smaller concentrations or complete absence of such granules toward the middle of the "islands". In some animals, the tissue "islands" seem to be tightly packed with large amounts of the material throughout; in others it is scattered, but with the heaviest concentration of it along the capillaries. Individual Class II granules have been observed to change slightly in size and configuration during the course of an experiment. Some of this material stains vitally with neutral red and some does not.

The third of these materials, Class III (Figs. 3 and 4), consists of tiny light globules which occur in the "islands" of tissue in the zone of primary capillaries (Zone 3) and do not have nearly the refractility of the granules of Class I. Whether these actually represent granules of some substance or simply small areas in the tissues between the capillaries where some material has been removed, we do not as yet know. Class III material does not stain with either neutral red or methylene blue.

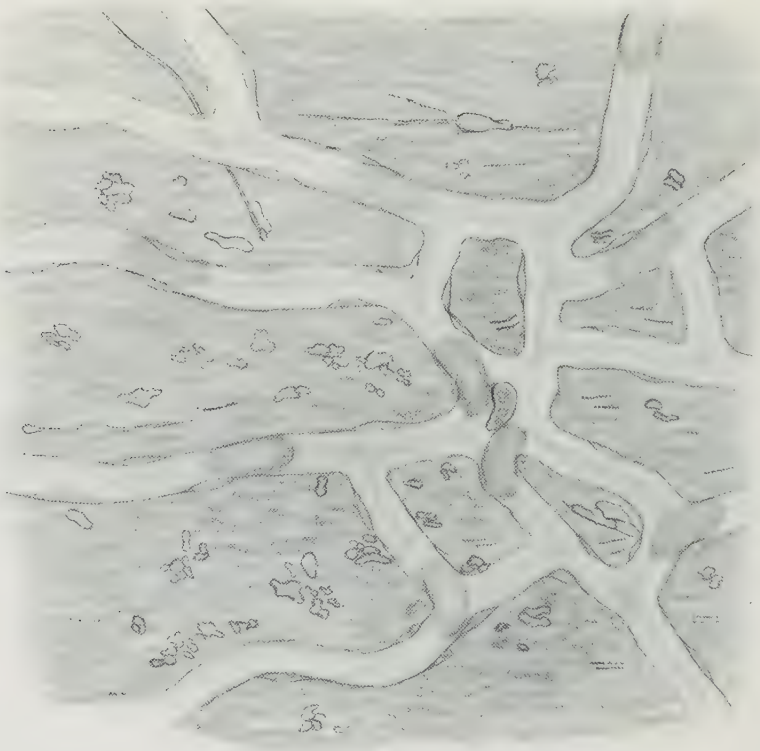


Fig. 5. Zone 2. Class IV material: irregular "hyaline" or "glassy" masses. Class V material: short strings of very fine granules having a beaded appearance. A few fibers appear in this field. Anterior to the left. Initial magnification 900 ×

A fourth morphologically separate type of granular material, Class IV, occurs primarily between the parallel capillaries (Zone 1) and in the transition zone (Zone 2) where the parallel capillaries join with the principal primary capillary plexus of the median eminence (Figs. 5 and 6). This material consists of "glassy" or "hyaline" particles or granules varying widely in size from granules in the range of 2—3 μ in largest diameter to pieces which are about half the size of a frog red cell. This material may occur as tear-drop-shaped particles, or it may be round, oval or irregular in shape. These particles occur in the tissues between capillaries and do not show any special anatomical relationship to the borders of capillaries. However, similar particles have been observed attached to fibers (vide infra) in the region of the tractus hypophyseus. These droplets and small

particles (Class IV) have on occasion shown a greater concentration in the transition zone than higher in the tractus hypophyseus. Some of them stain fairly intensely with neutral red, particularly the larger particles and those associated directly with the fibers. It is, of course, impossible to say on the basis of morphologic criteria alone that all of these particles of Class IV are the same material.

Still another morphologic type of particle, Class V, has been observed (Fig. 5). Very fine granules or droplets of material (much smaller than particles of

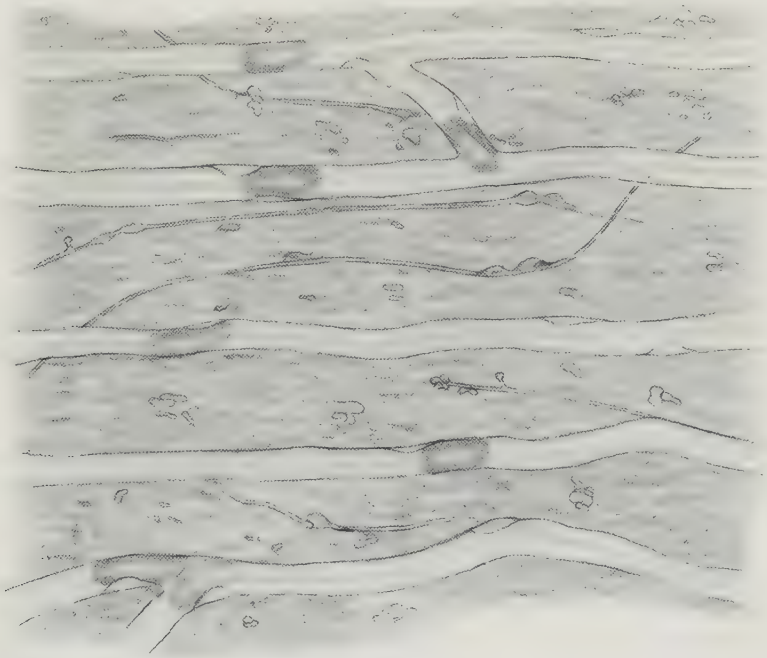


Fig. 6. Zone 1. Fibers showing bulges along their courses and attached particles having the same appearance as Class IV material. The strips of tissue adjacent to the three capillaries at the bottom of the field show vague "tracks" showing a distinct orientation of material in the same direction as the capillaries although only a few continuous fibers are seen. Anterior to the left. Initial magnification 900 ×

Classes I, II or IV) which have a sort of beaded arrangement reminiscent of streptococci, occur in the tissues between the parallel capillaries in the midline. These occur most frequently in the transition zone (Zone 2) and are most concentrated there. They are almost always present.

III. Fibers

Fibers, which preliminary measurements show to be about 2 μ in diameter, are found in the region occupied by the tractus hypophyseus (Fig. 6). These appear to be nerve fibers. They pass downward in the midline (from the general vicinity of the optic chiasma) in the infundibular tissue in Zones 1 and 2 toward the median eminence. These fibers do not occur on the surface of the tissues in these fields but deeper, below the level of the capillaries. Sometimes only a few of them are visible, sometimes many. At times they have the "glassy" or

"hyaline" particles described above (Class IV) closely attached to them, and sometimes they do not. We are not able to say that these particles are within these fibers. Not infrequently dilatations or bulges may be observed along their courses.

The fibers are of considerable interest for a number of reasons. One of these. is their visual inconstancy. They are not detectable in equal numbers in every preparation, and in some preparations they are not detectable at all. Sometimes fibers in smooth continuity can be traced for some distance in the region occupied by the tractus hypophyseus. Sometimes a fiber which can be so traced shows discontinuity and something which appears to be akin to fragmentation in one or more places along its course. Changes in the apparent diameters of fibers and in size and configuration of attached particles have been observed, but we have not seen cytoplasmic streaming or linear movement or small objects within them. In many specimens where only one or two such fibers can be seen or even none at all, there appears to be "glassy" or dark material laid out in straight and more or less parallel lines in the same regions in which these fibers occur. Also, such lines of this "glassy" or "hyaline" material can be seen in some animals where uninterrupted fibers can be observed quite clearly (Fig. 6).

Horizontal and sagittal serial sections of frog brain and pituitary stained by the chrome-alum hematoxylin phloxine method reveal particles in the median eminence and infundibular region deep to the primary and parallel capillaries and superficial to the ependyma. In some slides there is a greater concentration of the CAH positive material in the transition zone (Zone 2) than in the median eminence (Zone 3) or higher between the parallel capillaries (Zone 1) and it is exceeded in its density only by the concentration of positive material in the posterior lobe proper. Identification in the living animal of material which will stain with chrome-alum hematoxylin in fixed preparations has been made only in the case of the last two classes of material described; that is the "glassy" or "hyaline" material occurring between the parallel capillaries and showing a strong concentration in the transition zone (Class IV) and the much finer small beads of material occurring in the same area (Class V). On the basis of appearance, location, variation in particle size, and orientation and variation in external configuration, we believe that we have been able to identify these two classes of particulate matter as neurosecretory material in the sense that they occur in the infundibulum or along the preoptico-hypophyseal tract and are stained by chrome-alum hematoxylin when fixed and sectioned. Many of the larger particles appear in the living to be homogeneous while particles of similar size and location in fixed sections have shown a fine, granular structure.

The observations on the various granular structures given above show quite clearly that they are not static or inert but are undergoing detectable changes. These changes are under continuous study at present and we feel that a detailed description of them and their possible functional significance requires further work.

Discussion

It was noted above that, on the basis of appearance, location, variation in particle size, and orientation and variation in external configuration, the "glassy", "hyaline" materials and fine beads (Classes IV and V) occurring in the transition zone and between the parallel capillaries (Zones 2 and 1) can be identified with

chrome-alum hematoxylin stained material in tissue sections. It seems safe to assume that this is neurosecretory material and that such material in its native form has the same anatomic distribution which has been described for it in fixed and stained preparations. However, no such inference may be drawn from observations on the remaining particles (Classes I, II, and III) which we have studied thus far, nor can we, on the basis of the observations reported in this paper, state with certainty that the fibers which we have seen are, indeed, nerve fibers of a neurosecretory nature, although this seems likely.

Attempts to identify positively by fixation and staining techniques the fibers described above have met with no success. We have considered the following possibilities concerning the nature of these fibers: (a) that they are nerve fibers (neurosecretory or otherwise), (b) that they are the processes of glial cells, and (c) that they are objects foreign to the frog, such as fungi. In the region of the infundibulum the long roughly parallel courses between capillaries ventrally and ependyma dorsally suggest close association with the tractus hypophyseus. However, if they are nerve fibers, they are not the only ones present. Preliminary observations which will be reported in detail later suggest that these fibers, if they are nerve processes, show more dramatic changes in diameter and shape than other nerve fibers or that nerve fibers in general show more such change than is generally suspected. The length of the processes which we have observed (some 250 μ or longer along their visible courses) suggests that they are not glia and they do not show an orientation in the tissue which would support the suspicion that they are fungi. In regard to this latter consideration, histologic sections stained with hematoxylin and eosin, chrome-alum hematoxylin, and the periodic acid-Schiff reaction have failed to show them in specimens in which they were clearly visible in the living animal. In addition, tissues fixed in buffered osmium tetroxide and examined with a phase microscope and tissues prepared according to the Noñidez technique for nerve fibers also failed to demonstrate these fibers in tissues in which they were clearly visible in the living animal.

The precise nature of the other particles and their functional role in neurohypophyseal physiology must await further observation and experimentation. The observation of this rather startling number of morphologically separable materials, however, does indicate several possibilities. One is that there are several different kinds of neurosecretory processes or several distinctly different phases of a single basic neurosecretory process occurring in different areas in the neurohypophysis. The second is that local factors play a much more important role in the neurosecretory phenomenon than heretofore believed. This latter consideration is emphasized by the recent work of Leveque and Small (1959) in which they found changes in mitotic activity of pituicytes in dehydrated rats. Still a third consideration is the conclusion (which is inescapable) that fixed tissue techniques, no matter how refined, do not give anything near a complete picture of the histologic structure of the neurohypophysis. On purely theoretical grounds it is, of course, impossible for static material to show, even in serially prepared animals, the time dimension, and it is worthy of note that the histologic picture in the neurohypophysis of the living animal can change quite markedly from hour to hour or even from minute to minute.

One of the initial purposes of this study was to examine those histologic structures which were involved in the neurosecretory mechanism and to try to obtain from the observations information concerning the actual mechanism of transport of neurosecretory materials from nerve endings or other parts of the neuron into the capillary vessels of the neurohypophysis. Although we hoped to see some visual manifestation of the neurosecretory process, we recognized, nevertheless, that a number of factors might eliminate the possibility of obtaining any information concerning this process from the living animal. The factors which we considered are as follows: (1) that the neurosecretory material which one observes in stained sections might be a repeatable fixation artifact in the sense that this material had been precipitated or coagulated in some way from a crystalloid or colloid state which is not visible at all in the living animal; (2) even if particulate matter existed in life it is possible that any transport across endothelial barriers or cell membranes or through tissues occurs at a molecular level which would not be detectable by the methods used in this study; (3) if there are movements of visible materials along axons, through tissues or across vascular membranes, the process might well be too slow for detection visually without special aids such as time-lapse photography; (4) although the problem was not strongly considered initially, it soon became apparent that there was more histologic detail present in the living animal than had heretofore been detected by fixed tissue techniques and that this would lend sufficient complexity to the problem to require a detailed analysis of the histology of the living animal before the problem of the neurosecretory processes could be dealt with properly.

It is apparent from the above considerations that factor (1) can be dismissed in that some of the details of structure which we see in the living animal can be identified with chrome-alum hematoxylin stained material. The stained material is not merely a repeatable fixation artifact.

In regard to factors (2) and (3), the possibility still exists that some of the transport occurs across the endothelial barriers or through tissues on a molecular level; however, preliminary observations on minute to minute and hour to hour changes in the histologic structure suggest that some aspects of this transport are visible and can be defined by further study. It also follows that some movement and changes in the histologic picture are taking place rapidly enough to be followed with the eye without time-lapse photography.

Finally, in reference to factor (4), some early success at analyzing histologic detail in the living animal has been achieved. The identity of two of these materials (Classes IV and V) has already been alluded to and we feel that it has been reasonably well established; in the case of the other materials it has not. We considered several possibilities concerning the nature of Class I granules. The first and most obvious is that the cells containing these granules might be mast cells which are known to occur in the neurohypophyseal tissue in some animals (Gray 1934). They do not have, however, the typical appearance of mammalian mast cells, they do not stain with methylene blue or with neutral red in vivo, and no precisely comparable cells have been observed by us in the frog mesentery under similar conditions. There is the possibility that these are perivascular phagocytic cells. Granules which one sees in the cytoplasm may be materials arising from other cells or structures in the neurohypophyseal tissue or

the hypothalamic tissue proper and may have been ingested by these cells. The third possibility is that they are cells specific for the neurohypophysis, or the brain in general in the frog, and have some special function as yet unknown. The fourth possibility is that they are connective tissue cells common to many tissues in the frog. The cells are not leukocytes.

Class II granules may be another form of neurosecretory material. Much of it has a distinct affinity for the borders of capillaries of the median eminence (Zone 3) and may fill the tissues between the capillaries in this zone. However, it does not appear to stain with the selective neurosecretory stain chrome-alum hematoxylin. Very faint or unstained particles resembling Class II have been found in the tissue of Zone 3 in chrome-alum hematoxylin phloxine preparations, but no correlation between amount of chrome-alum hematoxylin positive material and amount of Class II material in this region could be made.

The third of these granular materials, Class III, consists of very small light globules which give a stippled texture to the tissue between the primary capillaries in Zone 3. They show no sign of staining with any dye either vitally or with chrome-alum hematoxylin in sections, and we have seen nothing in sections thus far which seemed to correspond to it.

Summary

The infundibular region in the leopard frog, *Rana pipiens*, was studied in vivo at magnifications of up to 900 diameters. This was accomplished by the use of an operative procedure which allowed for transillumination of the region and the introduction of specially modified water immersion lenses of 50, 70 and 90× into the field of study. This procedure is described.

Details of the living histologic structure in the infundibular region were related to the capillaries of the complex vascular apparatus of that region and the region was divided into five zones on the basis of capillary patterns occurring in given areas. Living histologic structure of this region includes five different morphologic types of granular materials. Two of these materials could be identified with chrome-alum hematoxylin positive particles in fixed and stained sections. Fibers about 2 μ in diameter varying widely in numbers seen from animal to animal were observed in the region of the tractus hypophyseus. These fibers have not been positively identified as nerve fibers. Some of the particles and the fibers show changes in position and/or configuration with time. The location of the fibers, their appearance, and the location, appearance, and distribution of the particles are described. The implications of the observations made are discussed.

Acknowledgement. The author wishes to acknowledge with thanks the drawings by Mrs. Mary Anne Johnson which appear in the article.

References

Bargmann, W.: Über die neurosekretorische Verknüpfung von Hypothalamus und Neurohypophyse. Z. Zellforsch. **34**, 610—634 (1949).

— B. Hanström, B. Scharrer u. E. Scharrer (Ed.): Zweites Internationales Symposium über Neurosekretion. Lund 1957; Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1958.

Dawson, A. B.: Evidence for the termination of neurosecretory fibers within the pars intermedia of the hypophysis of the frog, *Rana pipiens*. Anat. Rec. **115**, 63—67 (1953).

Gray, J. H.: Preliminary note on the mast cells of the human pituitary and of the mammalian pituitary in general. J. Anat. (Lond.) **69**, 153—158 (1934).

Green, J. D.: Vessels and nerves of amphibian hypophyses. A study of the living circulation and of the histology of the hypophysial vessels and nerves. Anat. Rec. **99**, 21—53 (1947).

—, and V. L. van Breemen: Electron microscopy of the pituitary and observations on neurosecretion. Amer. J. Anat. **97**, 177—228 (1955).

Houssay, B. A.: Hypophyseal functions in the toad *Bufo arenarum*, Hensel. Quart. Rev. Biol. **24**, 1—27 (1949).

— A. Biassoti et R. Sammartino: Modifications fonctionelles de l'Hypophyse après les lésions infundibulo-tubériennes chez le crapaud. C. R. Soc. Biol. (Paris) **120**, 725—727 (1935).

Leveque, T. F.: Changes in the neurosecretory cells of the rat hypothalamus following ingestion of sodium chloride. Anat. Rec. **117**, 741—758 (1953).

—, and M. Small: The relationship of the pituicyte to the posterior lobe hormones. Endocrinology **65**, 909—915 (1959).

Palay, S. L.: The fine structure of the neurohypophysis. In: Ultrastructure and Cellular Chemistry of Neural Tissue, H. Waelsch, edit., p. 31—49. New York: Hoeber 1957.

Rothballer, A. B.: Changes in the rat neurohypophysis induced by painful stimuli with particular reference to neurosecretory material. Anat. Rec. **115**, 21—36 (1953).

Scharrer, B.: The role of neurosecretion in neuroendocrine integration. In: Comparative Endocrinology, A. Gorbman, edit., p. 134—148. New York: Wiley 1959.

Scharrer, E.: General and phylogenetic interpretations of neuroendocrine interrelationships. In: Comparative Endocrinology, A. Gorbman, edit., p. 233—249. New York: Wiley 1959.

Dr. W. Curtis Worthington, Jr., Department of Anatomy, Medical College of South Carolina, 16 Lucas Street, Charleston, South Carolina

Zeitschrift für Zellforschung 55, 649—661 (1961)

Instituto de Anatomia General y Embriologia. Facultad de Ciencias Médicas, Buenos Aires (Argentina)

THE ACTION OF GLUTAMATE AND THE PROBLEM OF THE "EXTRACELLULAR SPACE" IN THE RETINA

AN ELECTRON MICROSCOPE STUDY*

By

Flora Wald and E. de Robertis

With 7 Figures in the Text

(Received July 17th 1961)

In a previous work morphological evidences were given that in the central nervous system (CNS) there is not a typical extracellular space such as found in other tissues (Gerschenfeld, Wald, Zadunaisky and De Robertis 1959). The plasma membranes of all the cellular elements appear under the electron microscope in intimate contact among themselves and with the basement membrane of the capillaries. The distance between the adjacent membranes is of only 120—250 Å and is filled with a cementing material of definite electron density. Furthermore, in brain slices incubated in vitro and which had swollen up to about 30% by weight, no extracellular space was observed and the above distance between membranes was maintained. In these experiments there was a considerable swelling of the astrocytes. The conclusion was reached that astroglia functions in the CNS as a water-ion compartment probably involved in the selective transport of fluids and metabolites between the vascular system and the neurons.

Several electron microscope observations of the normal retina of different species have similarly shown the lack of a typical extracellular space (De Robertis and Franchi 1956, Sjöstrand 1958, 1961). It remained to be studied if, after incubation in an isotonic solution, the retina would behave in the same way as the slices of CNS. The experiments of Ames and Hastings (1956) and Terner, Eggleston and Krebs (1950) with Ringer without glutamate has already shown, that this is not the case since the retina showed no swelling and on the contrary a diminution in weight after incubation. Ames and Hastings (1956) and Ames (1956) measured in the rabbit's retina the so-called "extracellular space" with inulin and chloride and found spaces of 29 and 39% respectively. They also observed that with the addition of glutamate in the incubating medium there is an increase in the "intracellular fluids" of the retina.

Our electronmicroscopic observations of the retina were undertaken to study the apparent contradiction between the morphological and physiological data regarding the "extracellular space" and at the same time to try to determine the localization of the excess water incorporated after the addition of glutamate. It was thought, that this study of incubated retinae would also give information about the nature and function of the Müller cells which are sometimes considered as a special type of astroglia (Marchesani). Because of the large size of the Müller

* Work supported by a research grant from the Air Force Office of Scientific Research (5—60), U.S.A.

cells in the retina of the turtle (Villegas 1960) after a few experiments in mammalian retinae, the above tissue was chosen.

As in the case of the CNS (Gerschenfeld et al. 1959) the lack of a real extracellular space was confirmed in the retina. In this case however there is not a special swelling of some of the cellular components and the Müller cells do not show the reaction found in the astrocytes in the CNS. Furthermore the water surcharge induced by glutamate was found to be strictly localized at the inner plexiform layer and ganglion cells of the retina. In this respect the two synaptic strata of the retina showed a strikingly different behaviour.

Methods

Retinae of the land turtle *Testudo chiloensis* were used. The tissue was rapidly extirpated and immersed in the incubating medium. Four series of experiments were made. In each case, in addition to the normal control, other retinae were incubated in a) Ringer-bicarbonate as modified by Ames and Hastings (1956), b) in the same solution plus the addition of 5 mM/l of sodium-l-glutamate, and c) in Ringer phosphate as used by Pappius and Elliott (1956) on brain slices. The tissues were incubated under agitation during 30 minutes in Warburg's vessels gased with 95% O_2 and 5% CO_2 for the Ringer-bicarbonate and with pure O_2 for the Ringer-phosphate.

After this treatment, the tissue — as was the case with the control retinae — was fixed in 1% OsO_4 in Periston (Bayer) and then embedded in methacrylate. The electronmicrographs were taken with an RCA EMU 2E electron microscope with a compensated objective lense.

Observations

1. Description of the Müller cell in incubated retinae

In the normal and incubated retinae of the turtle, Müller cells have a considerable size and are easily recognized throughout the different layers from the outer to the inner limitans[1] (Fig. 1). The nucleus is oval in shape and localized in the outer portion of the inner nuclear layer. It has a homogeneously distributed chromatin and a small dense nucleolus. The nuclear region is surrounded by a thick layer of cytoplasm which sends processes towards both the outer and inner layers (Figs. 1 and 3). The thick outer processes of the Müller cell cross the outer plexiform or synaptic layer and penetrate in between the photoreceptor cells of the outer nuclear layer to reach, by way of thinner expansions, the outer limitans. It is interesting that both the synaptic elements and the photoreceptors are completely surrounded by the Müller elements without any extracellular space in between. At the outermost limit of the Müller processes there are dense adhesion bands or plates (desmosomes) that thightly unite them together and with the visual cells (Figs. 1 and 2). Beyond the horizontal plane formed by these adhesion plates, the Müller cell processes send thin microvillous projections filled with vesicles that surround the inner segment of the photoreceptors.

One striking feature of the Müller cell of the turtle is the fact that mitochondria are almost completely lacking around the nucleus, along the entire inner processes and most of the outer processes. Only in the outermost portion near the outer limitans numerous tightly packed mitochondria are found.

In the inner plexiform layer Müller cells send thick processes that divide into thinner ones and surround the axons and dendrites present in this layer. Thin

[1] The illustrations used in this paper are from incubated material, the controls done in each case are not reproduced to avoid repetitions.

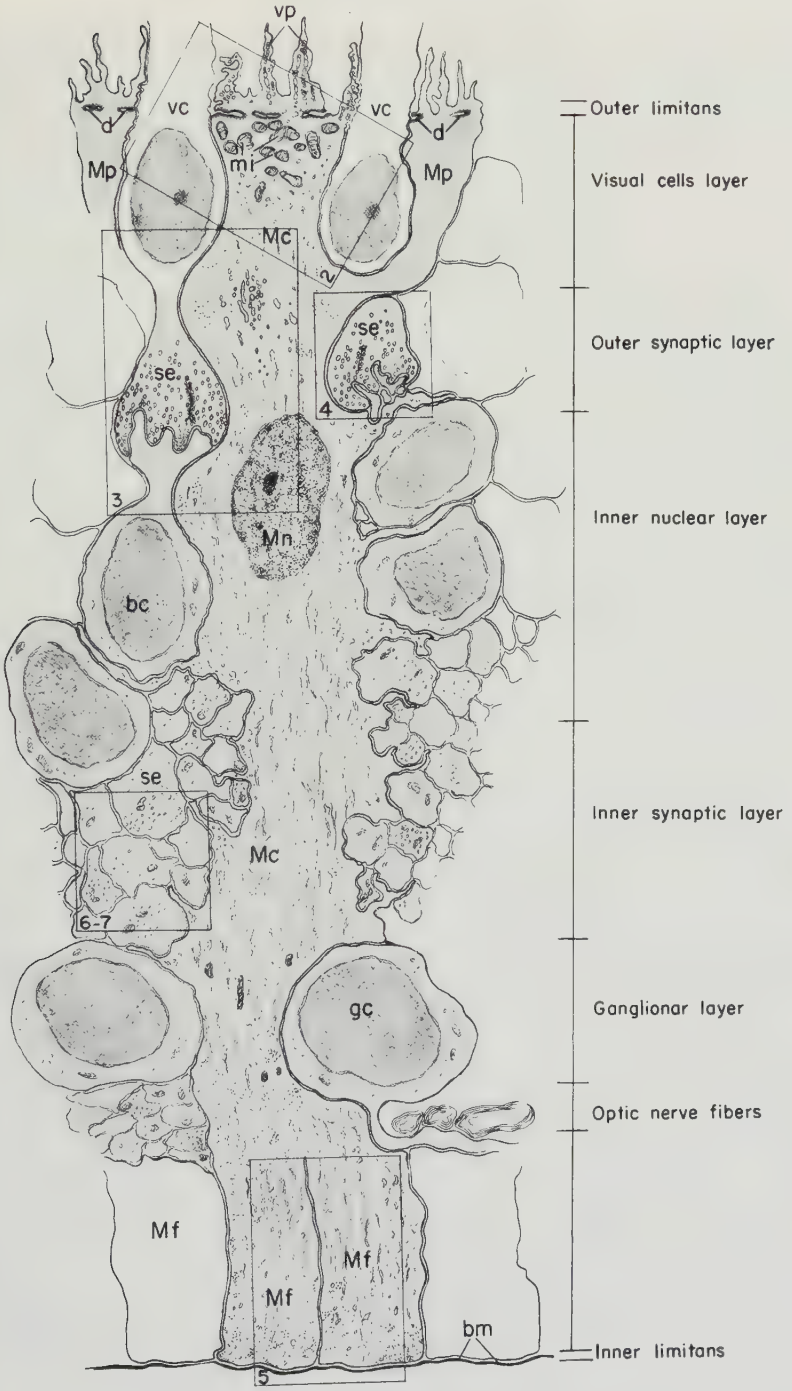


Fig. 1. Diagram of the Müller cell and different layers of the retina of the turtle as observed with the electronmicroscope. The inserts represent approximate positions of the other figures. *bc* bipolar cell; *m* basement membrane; *d* desmosome; *gc* ganglion cell; *mi* mitochondria; *Mc* Müller cytoplasm; *Mf* Müller feet; *Mn* Müller nucleus; *Mp* Müller process; *se* synaptic ending; *vc* visual cell; *vp* villous projection

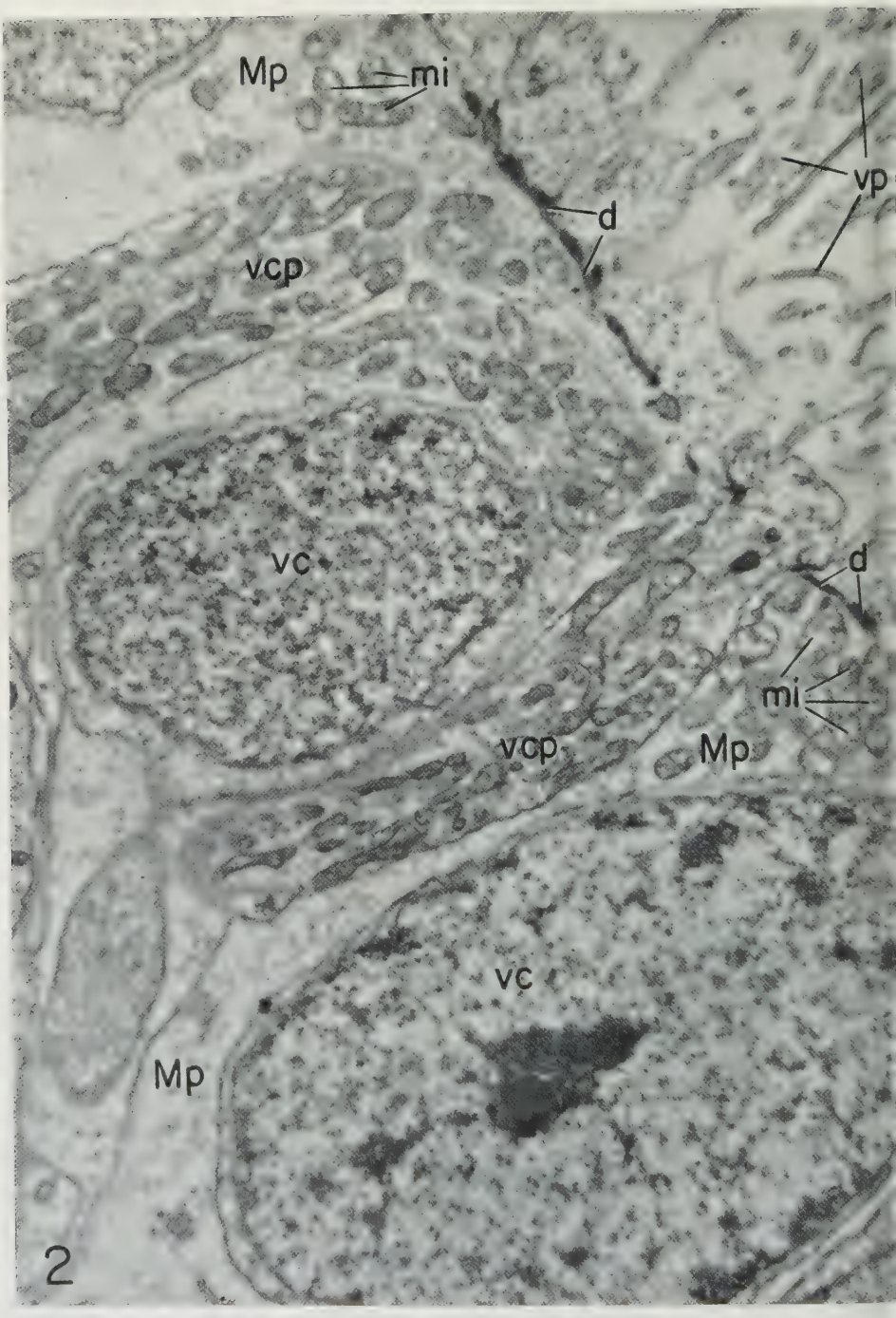


Fig. 2. Electronmicrograph of the outer layers of the retina. There are two visual cells with scanty cytoplasm *Vc* and surrounded by Müller cell processes *Mp*. Notice the accumulation of mitochondria *mi* the desmosomes *d* and villous projections *vp* at the terminal portion of these processes. In this figure as in the rest, no extracellular space appears between the contacting membranes of adjacent cellular elements. *vcp* visual cell process. Incubated in Ringer with 5 mM/l glutamate. ×18540

processes pass in between the ganglion cells and finally rejoin to make the thick parallel feet that reach the inner limitans (Figs. 1 and 5). This innermost portion of the retina is exclusively formed by the prismatic feet of the Müller cells, which are covered at the base by a thick basement membrane. An interesting difference of this inner portion, as compared with the outer one, is the lack of desmosomes or adhesion plates in between the Müller cell feet. This fact may explain, as it will be seen later, that in the incubated retinae the processes may at certain points become mechanically detached forming an artificial extracellular space. The cytoplasm of the Müller cell is rather compact and dense in the inner portions and less dense in the outer processes. It is filled with a finely divided material in which there are tubulo-vesicular elements without ribosomes. In the matrix an extremely thin filamentous material oriented along the cell axis is apparent.

In the incubated retina the structure of the Müller cell is well preserved and shows no great differences with the normal control (not shown in the figures). Occasionally at the innermost end the feet of the Müller cell may become separated as explained above. In other regions the outermost portion and the microvilli may become more clear and swollen. In both cases we interprete these localized changes as being of traumatic origin.

2. Differences between the retina incubated in Ringer and in Ringer-glutamate

The general structure of the incubated retina is surprisingly well preserved both in Ringer with or without glutamate. There is however a great difference between both treatments at the level of the inner synaptic layer and the ganglionar cells.

The outer synaptic layer shows an excellent preservation in both media (Fig. 4) with normal looking synaptic vesicles and synaptic ribbons. Also the visual cells and the inner nuclear layer are well preserved. In the inner plexiform layer of the retina incubated in Ringer without glutamate, the structure is not different from that in the normal (Fig. 6). Synaptic endings with few mitochondria, synaptic vesicles and an occasional synaptic ribbon are observed together with processes of the Müller cells and dendrites of the ganglion cells.

The addition of sodium-l-glutamate to the incubation medium produces a great swelling of the contacting processes in the inner synaptic layer. They appear ballooned with a watery content and swollen mitochondria (Fig. 7). In most cases the synaptic vesicles have entirely disappeared from the endings. Few of them show ghost-like vesicular elements indicating probably the existence of lysis of synaptic vesicles. It is interesting that in the same region the small processes of the Müller cells are not swollen and only show a slight dilatation of the tubulovesicular component. Sometimes these Müller processes are compressed by the swollen nervous endings. This swelling affects generally the total thickness of the inner synaptic layer, but it tends to be more marked in the innermost regions.

The ganglion cells may also undergo changes under the action of glutamate, but this effect is not as striking and total as in the inner synaptic layer. In some cells the changes are slight and consist of discrete vacuolization of the mitochondria and the endoplasmic reticulum. In others, the entire cytoplasm is swollen and appears very pale. It is interesting that the nerve fibers of the optic nerve appear entirely normal.

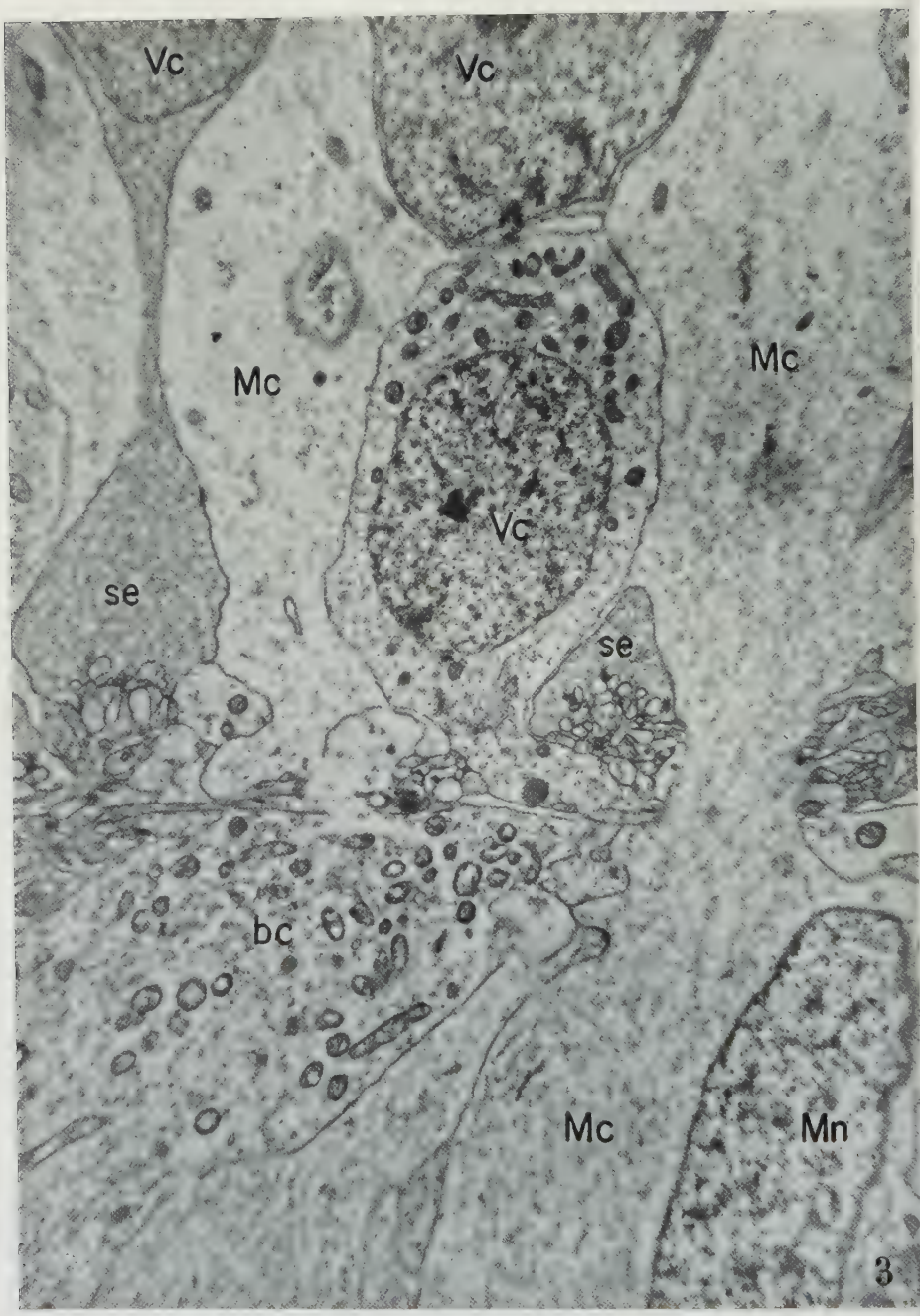


Fig. 3. Electronmicrograph of the inner part of the outer nuclear layer, outer synaptic layer and outer most part of the inner nuclear layer. A Müller cell's nucleus *Mn* surrounded by abundant cytoplasm *Mc* is shown in the lower right corner. Visual cells *Vc*, synaptic endings *se* with abundant synaptic vesicles and parts of bipolar cells *bc* occupy the rest of the figure. Incubated in Ringer with 5 mM glutamate. ×12420

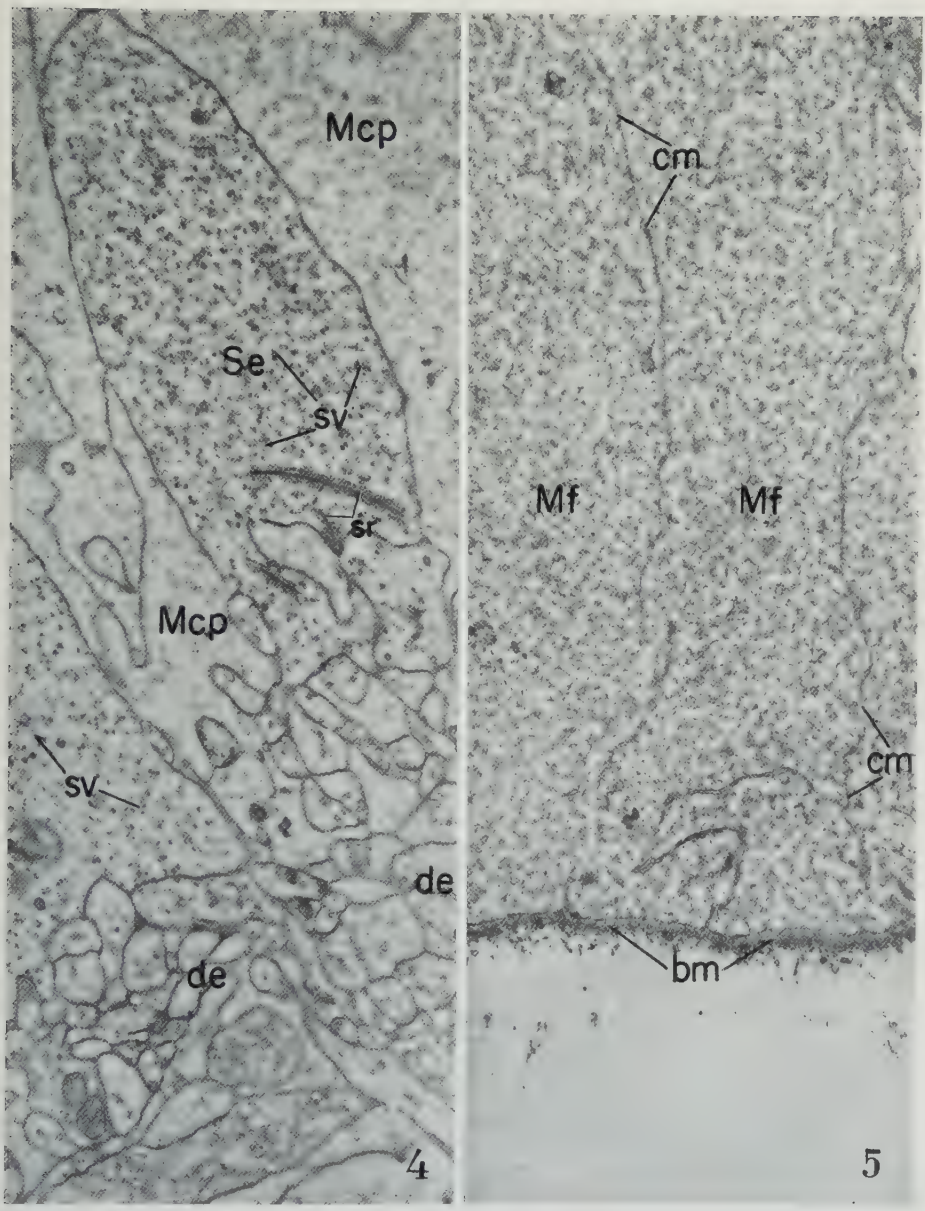


Fig. 4. Electronmicrograph of a synaptic ending *Se* of the outer plexiform layer with synaptic vesicles *sv* and synaptic ribbons *sr* in its interior. A plexus of dendritic expansions *de* gives rise to branches that approach the synaptic ending and make invaginated contacts with it. Müller cell processes *Mcp* surround the synapses. Compare the excellent preservation of this synaptic layer with that of the inner synaptic layer shown in Fig. 7. Incubated in Ringer with 5 mM/l glutamate. ×16480

Fig. 5. Electronmicrograph of Müller cell's feet *Mf* in the innermost layer of the retina. The feet are coated by a thick basement membrane *bm* which shows fine fibrillar projections adherent to the vitreous. *cm* cell membranes. Incubated in Ringer without glutamate. ×11040

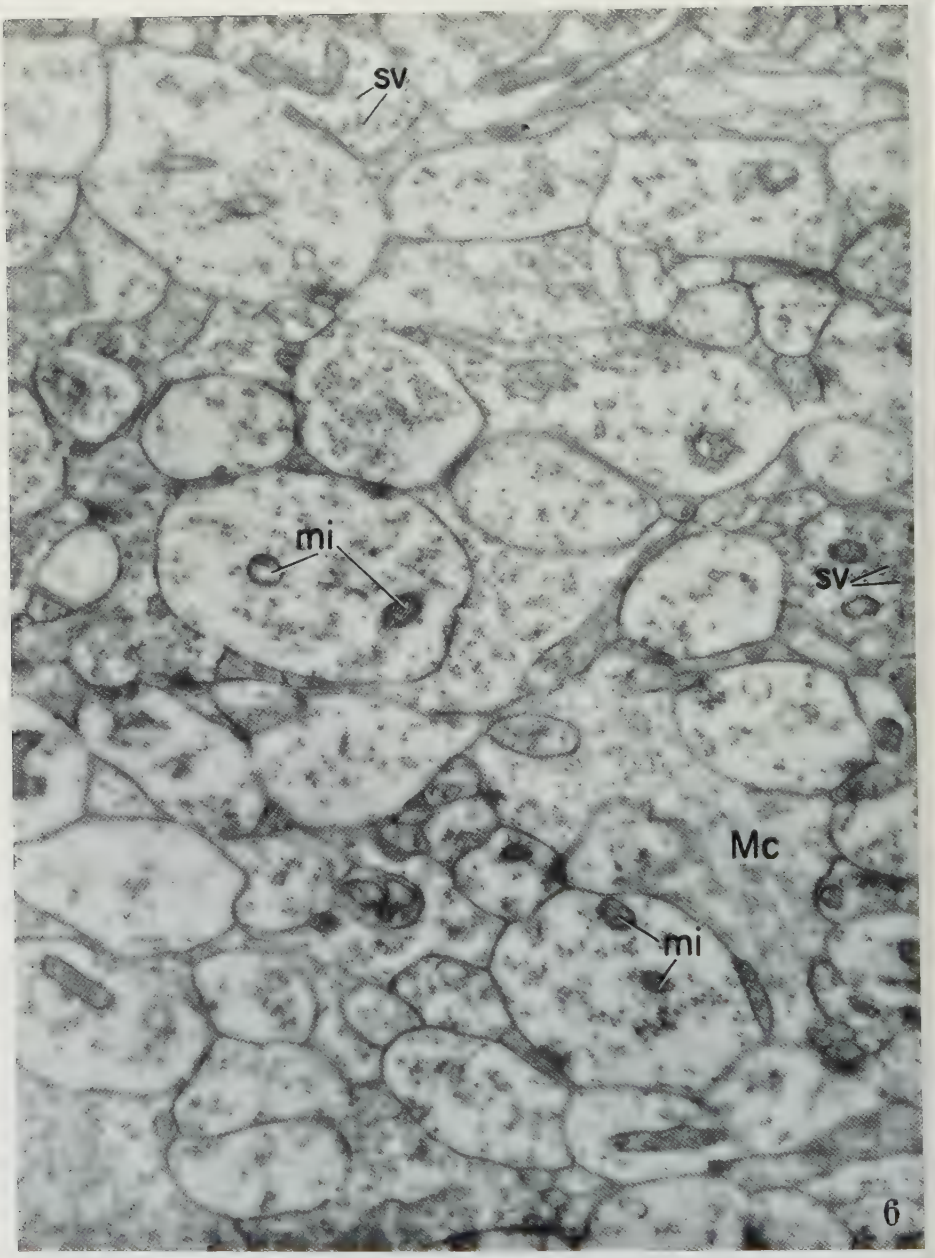


Fig. 6. Electronmicrograph of the inner synaptic layer showing profiles of the contacting elements, some of which show abundant synaptic vesicles *sv*. Compare with Fig. 7. *mi* mitochondria, *Mc* Müller cytoplasm. Incubated in Ringer without glutamate. ×23520

The feet of the Müller cells and the inner basal membrane show a similar aspect in both incubating media without notable changes with respect to the normal

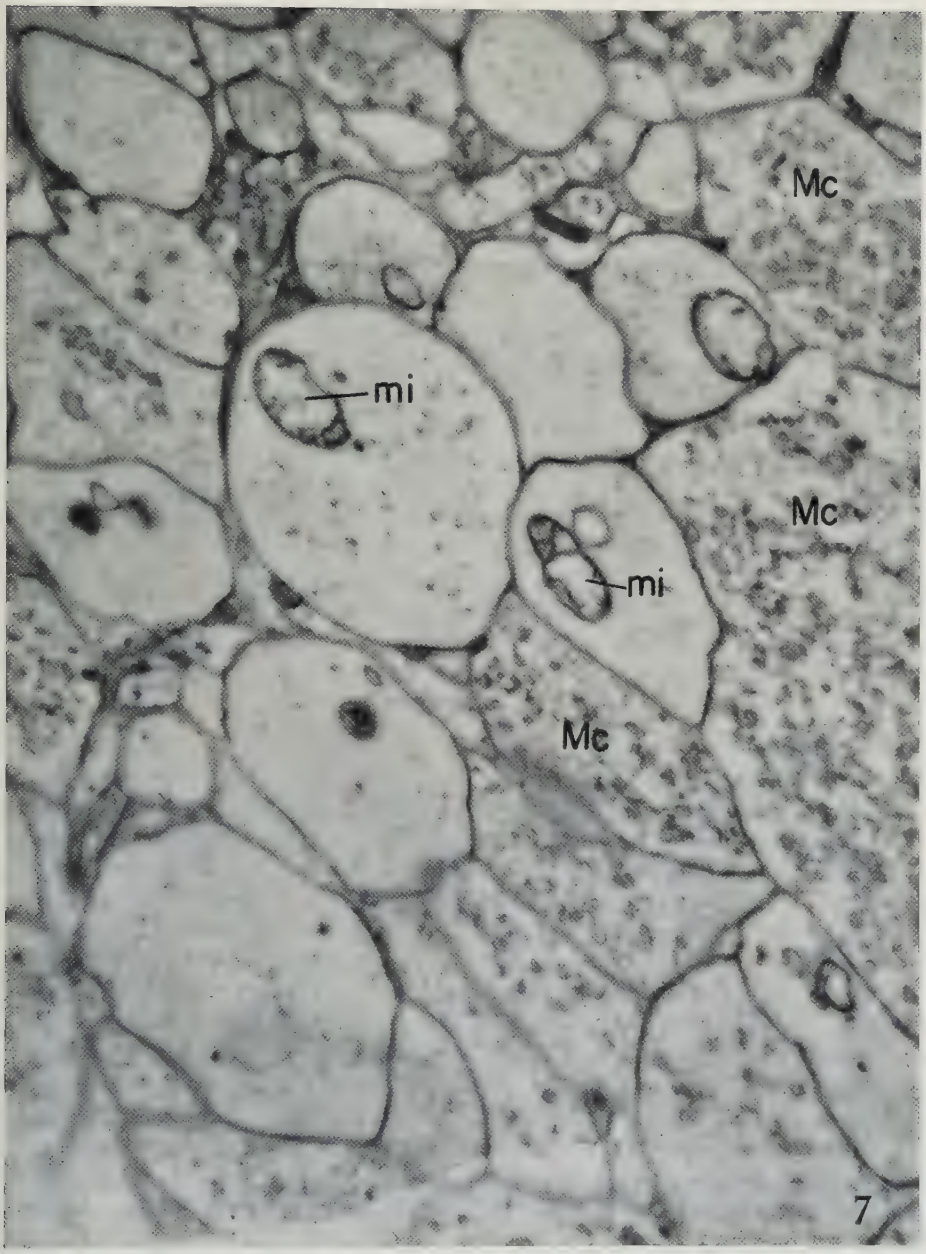


Fig. 7. Electronmicrograph of the inner synaptic layer after incubation during 30 minutes in Ringer with glutamate (5 mM/l). The profiles of the contacting synaptic expansions appear greatly swollen. Synaptic vesicles have disappeared and mitochondria *mi* are vacuolized. The Müller cell cytoplasm *Mc* appears slightly modified. ×18540

control. The incubations made in Ringer-phosphate (Pappius and Elliott 1956) show essentially a similar image as those in Ringer-bicarbonate (Ames and Hastings 1956) without glutamate.

In all cases, beyond a few spaces found in between the feet of the Müller cells and which can be considered as due to trauma, there is no real extracellular space in the incubated retina.

Discussion

1. The problem of the extracellular space in the retina

In a review on the "Submicroscopic Morphology and Function of Glial Cells" one of us has discussed the general problem of the extracellular space in brain tissue (De Robertis and Gerschenfeld 1961). The literature gives values of a chloride space of 31.4 to 50% (Davson 1958, Manery and Hastings 1939, Manery and Haege 1941) and of an inulin space of 14.5% in brain slices (Allen 1955). As mentioned above, in the retina the inulin space was found to be even larger and did not change by the addition of glutamate (Ames and Hastings 1956).

Our observations in the normal and incubated retina show the lack of a real extracellular space. All the cellular components are tightly packed and between the plasma membranes there is a zone of only 120—150 Å thick filled with a rather dense cementing material. In the case of the brain of Scylliorhinus, Horstmann and Meves (1959) have calculated that this region in between membranes could not exceed 5% of the total volume of the CNS. In the case of the retina this is probably even less. The obvious conclusion seems to be that, as in the case of the brain, in the retina the chloride and inulin spaces should be to greater extent intracellular.

2. Differences between the Müller cells and the astrocytes of the CNS

The striking difference in behaviour between an incubated mammalian brain slice and the retina is certainly remarkable. While in the former there may be a considerable swelling (Pappius and Elliott 1956) even in a hypertonic Ringer solution (Gerschenfeld et al. 1959), in the mammalian retina incubated in Ringer without glutamate the weight diminishes slightly (Terner et al. 1950, Ames 1956)[1].

It could be argued that this difference is due to the technical procedure used in both cases and particularly to the fact that the slicing may damage the cell processes of the neurons and glial cells of the brain. This possible artifact, not involved in the case of the retina, is discussed by several authors (McIllwain 1955, Davson and Spaziani 1959, De Robertis and Gerschenfeld 1961). The conclusion is reached that it is very improbable that the section of cell processes could be the cause of swelling in the brain tissue. In this respect the electron-microscope work of Gerschenfeld et al. (1959) has demonstrated that the swelling is exclusively produced in the astroglia cells and not in the neurons, being both probably cut in a similar proportion.

The difference in swelling might be due to a different cellular constitution and essentially to the fact that in mammals Müller cells do not behave as the

[1] We have tried to study the changes in water content of the retina of the turtle in Ringer and Ringer plus glutamate, but because of the adhesion of the vitreous we have been unable to determine with exactitude the weight changes. In this discussion we assume that the results on the mammalian retina (Terner et al. 1950, Ames 1956) can be applied to the turtle.

astrocytes. These two types of cells have in fact great differences in structure and in their connections. While astrocytes are tightly related to blood vessels by their vascular feet, Müller cells lack this relationship. In retinae having a vascularization of the inner layers some typical astrocytic feet can be observed. The retina of the turtle, as that of the rabbit studied by AMES (1956) is avascular, and typical astroglia is lacking. Our observations indicate that the differences in swelling between brain slices and retina could be a problem of different cell population. Müller cells have been considered by some to be special astroglial elements (MARCHESANI) and to others they are more related to the ependymal cells (KOLMER 1936).

In the case of the turtle's retina an interesting finding has been the lack of mitochondria throughout most of the Müller cell's cytoplasm and the concentration of all of them at the outermost region of the cell, below the microvilli that projects beyond the outer limitans. In this region we find numerous vesicles which could be interpreted as indication of an active transport by micropinocytosis. In a recent study of the turtle's retina, YAMADA (1960) has postulated a metabolic interrelationship between the visual cells and microvilli of the Müller cells. The presence of mitochondria may be indicative that this outer portion of the Müller cell is metabolically very active, as compared with other regions of the same cell and that the choroidal end of the Müller cell may have special permeability properties.

3. The action of glutamate on the retina

The action of glutamate on the retina has been studied both in vitro and in vivo. AMES and HASTINGS (1956) and AMES (1956) found that after incubation with Ringer-glutamate there is an increase in "intracellular water, chloride and sodium". Potassium leaks in the first minutes and then is restored. Other authors (TERNER et al. 1950, STERN, EGGLETSON, HEMS and KREBS 1949) found that both the brain and the retina actively accumulate glutamate if there is glucose and oxygen in the medium of incubation and that the maintenance of K is also dependent on the presence of glutamate or aspartate in the medium. They suggest that K could be the cationic equivalent of glutamate.

The observations reported in this paper show a considerable difference in retinae incubated with glutamate as compared with those in Ringer alone. Ganglion cells show a variable degree of vacuolization while the inner synaptic layer is enormously swollen and altered. It seems that these synapses are specially sensitive to glutamate and in this respect it is pertinent to mention that in a previous work on brain slices (GERSCHENFELD et al. 1959) we also found swelling of some nerve endings with glutamate. This finding would indicate that the surcharge of water, Cl^- and Na^+ found by AMES (1956), with glutamate is strictly localized in these inner layers. It is interesting in this respect that the administration of large amounts of glutamate to the mouse produces histological lesions of the inner layers of the retina (LUCAS and NEWHOUSE 1957). The action of glutamate on the retina becomes even more striking when one compares the alteration of the inner synaptic layer with the excellent preservation of the outer synaptic layer, in which the synaptic vesicles seem to be even more numerous that in the control animal.

There are several known differences in morphology and cytochemistry between the two synaptic layers. Both in the rabbit (De Robertis and Franchi 1956) and in the turtle, there are no mitochondria in the outer synaptic layer, while they are abundant in the inner one. Enzymes such as cholinesterase (Francis 1953, Gerebtzoff 1959) and glutamate dehydrogenase (Lowry, Roberts and Lewis 1956) have been found to be more abundant in the inner synaptic layer. Pharmacological studies suggest that these synapses are probably of cholinergic nature (Noell and Lasansky 1959). The nature of the outer synapses is unknown, but they do not seem to be cholinergic. Glutamate is normally present in nervous tissue (Krebs, Eggleston and Hems 1949) including the retine (Terner et al. 1950) and is involved in several metabolic pathways.

The local microinjection of glutamate is neurons of the spinal cord produces depolarization of the membrane and firing (Curtis, Phillis and Watkins 1959). A similar firing effect has been found in the ganglionar cells of the retina after microinjection in the inner synaptic layer (Noell and Lasansky, b).

The observations reported in this paper and the scattered data of the literature all imply that a profound difference in biochemical machinery and physiology exists between the outer and the inner synaptic layers of the retina. However the exact nature of the differences is still unknown and should be investigated further by all available methods.

Summary

Turtle's retinae were incubated in isotonic Ringer and then studied with the electron microscope in order to determine if in these conditions an extracellular space appeared. In the incubated retinae, as in the normal ones no extracellular space was observed. The distance between adjacent membranes is of 120—250 Å and is filled with a cementing material.

The Müller cell of the turtle's retina is described. The existence, at the choroidal end of this cell, of villous projections filled with vesicles and the accumulation of mitochondria under these projections would suggest that a process of micropinocytosis takes place in this site, and that it may be metabolically more active. After incubation, Müller cells showed no appreciable changes, in contrast with what happens to astrocytes in incubated slices of CNS (Gerschenfeld et al. 1959).

The addition of sodium-l-glutamate to the incubation medium determined a marked swelling of the nervous endings in the inner synaptic layer and a similar though less pronounced change in the ganglion cells. This would indicate that the surcharge of water, sodium and chloride produced by glutamate (Ames 1956) is localized in this layer.

The selective action of glutamate on the inner synaptic layer, in contrast with the excellent preservation of the outer synaptic layer, is probably linked to differences in biochemistry and physiology of synapses in these two strata.

References

Allen, J. N.: Extracellular space in central nervous system. Arch. Neurol. Psychiat (Chicago) **73**, 241 (1955).

Ames, A. III: Studies in water and electrolytes in nervous tissue. II. Effect of glutamate and glutamine. J. Neurophysiol. **19**, 213 (1956).

Ames, A. III: and A.B. Hastings: Studies in water and electrolytes in nervous tissue. I. Rabbit retina: Methods and interpretation of data. J. Neurophysiol. **19**, 201 (1956).
Curtis, D.R., J.W. Phillis and J.C. Watkins: Chemical excitation of spinal neurons. Nature (Lond.) **183**, 611 (1959).
Davson, H.: Some aspects of the relationship between the cerebrospinal fluid and the central nervous system. In: Ciba Foundation. Symposium on Cerebrospinal Fluid, p. 189. London: Churchill 1958.
—, and E. Spaziani: The blood brain barrier and the extracellular space of the brain. J. Physiol. (Lond.) **149**, 135 (1959).
Francis, C.M.: Cholinesterase in the retina. J. Physiol. (Lond.) **120**, 435 (1953).
Gerebtzoff, M.A.: Cholinesterases: A histochemical contribution to the solution of some functional problems. London: Pergamon Press 1959.
Gerschenfeld, H.M., F. Wald, J.A. Zadunaisky and E.D.P. De Robertis: Function of astroglia in the water-ion metabolism of the central nervous system. Neurology (Minneap.) **9**, 412 (1959).
Horstmann, E., u. H. Meves: Die Feinstruktur des molekulären Rindengraues und ihre physiologische Bedeutung. Z. Zellforsch. **49**, 569 (1959).
Kolmer, W.: Die Netzhaut. In: W. v. Möllendorffs Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. 3/2, S. 295. 1936.
Krebs, H.A., L.V. Eggleston and R. Hems: Distribution of glutamine and glutamic acid in animal tissues. Biochem. J. **44**, 159 (1949).
Lowry, O.H., N. Roberts and C. Lewis: The quantitative biochemistry of the retina. J. biol. Chem. **220**, 880 (1956).
Lucas, D.R., and J.P. Newhouse: The toxic effect of sodium l-glutamate on the inner layers of the retina. A.M.A. Arch. Ophthal. **58**, 193 (1957).
Manery, J.F., and L.F. Haege: Extent to which radioactive chloride penetrates tissues and its significance. Amer. J. Physiol. **134**, 83 (1941).
—, and A.B. Hastings: The distribution of electrolytes in mammalian tissues. J. Biol. Chem. **127**, 657 (1939).
Marchesani, O.: Cit. by S.L. Polyak in The Retina, p. 364. Chicago: University Chicago Press 1941.
McIlwain, A.: Biochemistry and the central nervous system, p. 38. Boston: Little Brown & Co. 1955.
Noell, W.K., and A. Lasansky: Effects of electrophoretically applied drugs and electrical currents on the ganglion cells of the retina. Fed. Proc. **115**, 18 (1959).
— — Personal communication.
Pappius, A.H., and K.A.C. Elliott: Water distribution in incubated slices of brain and other tissues. Canad. J. Biochem. **34**, 1007 (1956).
Robertis, E.D.P. de, and C.M. Franchi: Electronmicroscope observations on synaptic vesicles in synapses of the retinal rods and cones. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, 307 (1956).
—, and H.M. Gerschenfeld: Submicroscopic morphology and function of glial cells. Int. Rev. Neurobiol. **3**, 1 (1961).
Sjöstrand, F.S.: Ultrastructure of retinal rod synapses of the guinea pig eye as revealed by threedimensional reconstruction from serial sections. J. ultrastruct. Res. **2**, 122 (1958).
— Electron microscopy of the retina. In: The structure of the eye, edit. G.K. Smelser, p. 1. New York: Academic Press 1961.
Stern, J.R., L.V. Eggleston, R. Hems and H.A. Krebs: Accumulation of glutamic acid in isolated brain tissues. Biochem. J. **44**, 410 (1949).
Terner, C., L. V. Egglerton and H. A. Krebs.: The role of glutamic acid in the transport of potassium in brain and retina. Biochem. J. **47**, 139 (1950).
Villegas, G.M.: Electron-microscopic study of the vertebrate retina. J. gen. Physiol. **43**, 15 (1960).
Yamada, E.: The fine structure of the paraboloid in the turtle retina as revealed by electron-microscopy. Abstract of the Symposium of Fine Structure of Eye (in press). 1960.

Dr. Flora Wald, Instituto de Anatomía General Embriología
Facultad de Ciencias Médicas, Buenos Aires (Argentina)

Zeitschrift für Zellforschung 55, 662—672 (1961)

Aus dem Institut für Genetik der Freien Universität Berlin, Berlin-Dahlem
(Direktor: Prof. Dr. H. Lüers)

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS „GESCHLECHTSCHROMATIN" BEI EINIGEN HAUSTIEREN MIT HILFE DES BUCCALTESTS

Von

Eva Struck*

Mit 9 Textabbildungen in 20 Einzeldarstellungen

(Eingegangen am 15. August 1961)

Einleitung

Seit der Entdeckung eines morphologischen Geschlechtsdimorphismus in den Nervenzellkernen der Katze durch Barr und Bertram (1949) wurden — insbesondere von der Barrschen Schule — zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, die der Fragestellung dienten, ob eine entsprechende kernmorphologische Geschlechtserkennung auch an anderen Geweben und an anderen Tierarten, einschließlich des Menschen, möglich sei. Die Ergebnisse (Lit. bei Hienz 1959) zeigten, daß die Mehrzahl der Säugetiere wie auch der Mensch in verschiedenen Geweben, ausgenommen das Nervengewebe, eine zytologische Geschlechtserkennung zulassen, wobei das charakteristische Chromatingebilde (Geschlechtschromatin) der Kernmembran innen anliegt.

Auch im peripheren Blut des Menschen und einiger Tierarten ließ sich an den segmentkernigen Leukozyten auf Grund des Vorkommens oder Fehlens eines trommelschlegelförmigen Gebildes (drumstick) eine zytologische Geschlechtsdiagnose durchführen (Davidson und Smith 1954; Th. Lüers 1956; Th. Lüers und H. Lüers 1958; Th. Lüers und E. Struck 1960).

Für die Arbeiten auf dem Gebiet der menschlichen Intersexualitätsforschung und der Geschlechtserkennung bei pathologischen oder unklaren Fällen der Geschlechtsdifferenzierung haben sich der Hautschnittest, der Mundepitheltest und der Leukozytentest als besonders geeignete, leicht anwendbare Methoden erwiesen. Im Hinblick auf die Natur jener Gebilde (Trommelschlegel in segmentkernigen Leukozyten und Geschlechtschromatin in Parenchymkernen) sind zwar in den letzten Jahren gut begründete Hypothesen entwickelt worden, doch besteht noch keine allgemeine Übereinstimmung in der Beurteilung.

Unter den verschiedenen Wegen, dieser Frage näherzukommen, wurde von uns die vergleichende Untersuchung an tierischen Objekten gewählt, welche wie der Mensch zur Klasse der Säuger gehören. Aus mehreren Gründen prüften wir verschiedene Arten von bestimmten Haustieren (Vorliegen einiger Kenntnisse über die chromosomalen Verhältnisse, Auftreten intersexer Individuen, gute Möglichkeiten der Materialbeschaffung). In Anlehnung an die humanmedizinischen Verfahren verwendeten wir zur Untersuchung der Ruhekernstrukturen die leicht zugängliche Backenschleimhaut. Unseres Wissens wurden die Kerne der Buccal-

* D 188.

epithelien innerhalb der Gruppe der Haustiere nur beim Rind auf karyologische Geschlechtsunterschiede untersucht (Osuchowska und Suminski 1957).

Unsere Studien sollten in erster Linie der Beantwortung der folgenden Fragen dienen.

1. Ist in den Ruhekernen der Buccalepithelien der Haustiere ein Chromatingebilde nachweisbar, das in morphologischer und histochemischer Hinsicht (Größe, Lage, Färbbarkeit) dem menschlichen Geschlechtschromatin vergleichbar ist?

2. Ist an den Buccalepithelzellen der Haustiere eine zellkernmorphologische Geschlechtserkennung auf Grund eines solchen Merkmals möglich?

Bei der Abhandlung der Untersuchungsergebnisse werden beide Fragen gemeinsam erörtert.

Material und Technik

Untersucht wurden ausschließlich Epithelzellkerne der Backenschleimhaut, um die Vergleichbarkeit der Befunde zu sichern. Das von uns ausgewertete Material stammt von Katze, Hund, Pferd, Esel, Schwein, Rind, Schaf und Ziege. Die Methode der Backenschleimhautuntersuchung bei Tieren bezeichnen wir als „Buccaltest".

Bei Katze, Hund, Ziege, Pferd und Esel erfolgte die Entnahme an dem lebenden Tier, bei Rind, Schwein und Schaf unmittelbar nach dem Schlachten während des Ausblutens. Nach Schleyers (1957) Untersuchungen an Epidermiszellen von menschlichen Leichen ist das Geschlechtschromatin bis zu etwa einer Woche post mortem nachweisbar. Zur Überprüfung der eigenen Technik und Gewinnung von Vergleichspräparaten wurden Vorversuche am Menschen durchgeführt. Zum Abstreichen benutzten wir einen Metallspatel oder ein kleines Messer mit stumpfer Schneide. Die Aufarbeitung des Materials zum Dauerpräparat erfolgte nach den Methoden von Klinger (1957) und Ludwig (1959), die in der verwendeten Farblösung modifiziert wurden.

Ausführung der Methode.

1. Schleimhautentnahme und Ausstreichen auf einem mit Eiweißglyzerin bestrichenem Objektträger;
2. *sofort* nach dem Ausstreichen (Präparat muß noch feucht sein) Fixierung in 95%igen Alkohol für 20 min bis 4 Std;
3. Präparate für 2 min in 70%igen Alkohol;
4. Hydrolyse in 5n HCl bei Zimmertemperatur für 20 min;
5. zweimaliger Wechsel in dest. Wasser, je 3—5 min;
6. Färbung, entweder a) mit gepufferter Thioninlösung (nach Klinger), oder b) mit Azur (II)-Farblösung (nach Ludwig), Färbedauer in beiden Fällen 30—60 min;
7. kurzes Abspülen in dest. Wasser;
8. Durchführen durch die aufsteigende Alkoholreihe 50 — 70 — 85 — 95 — 100%;
9. Einbetten in Euparal.

Herstellung der Farblösungen: Gepufferte Thioninlösung: 40 ml einer in 50%igem Alkohol gesättigten und dann filtrierten Thioninlösung mit 28 ml Michaelis-Puffer und 32 ml 0,1n HCl versetzen.

Azur (II)-Farblösung: 1 g Azur (II) in 200 ml dest. Wasser lösen und abfiltrieren. Von dieser Stammlösung 45 ml mit 45 ml dest. Wasser, 5 ml einer 10%igen Natriumbisulfitlösung und 5 ml 1n HCl versetzen und abfiltrieren.

Es wurden pro Tier 100 intakte Epithelzellkerne untersucht. Die Mutungsgrenzen für die Häufigkeiten der bei den männlichen Tieren erhaltenen Werte wurden nach Stevens (1942) für ein P von 0,01 berechnet.

Untersuchungsergebnisse

Vorversuche, Mensch. Die Auswertung der Präparate von 24 Normalpersonen (12 ♀♀ und 12 ♂♂) läßt einen deutlichen, kernmorphologischen Geschlechtsunterschied erkennen (Tabelle 1), wie er von früheren Untersuchern gefunden wurde. Ebenso konnten wir feststellen, daß das Geschlechtschromatin meist eine plankonvexe, seltener eine dreieckige oder flache

Form besitzt. Sehr selten besteht es aus zwei eng benachbart liegenden Partikeln, ein Doppelgebilde, das nach KLINGER (1957) „corpus bipartitus" genannt wird (Abb. 1).

a b c

Abb. 1a—c. Buccalepithelzellkerne, 1600×. *Mensch*, a u. b weiblich (b corpus bipartitum), c männlich

1. Katze. Die Untersuchungen an den freien Epithelzellkernen der Backenschleimhaut wurden an 11 weiblichen und 3 männlichen, unkastrierten Katzen durchgeführt. Die Kerne der weiblichen Tiere wiesen in rund 30% ein randständiges Chromatingebilde auf (Tabelle 1), das sich in Größe und Gestalt wie das vom Menschen her bekannte Geschlechtschromatin verhält (Abb. 2). An den Epithelzellkernen männlicher Tiere konnten praktisch keine mit einem derartigen Chromatinkörper vergleichbaren Gebilde nachgewiesen werden. Vereinzelt traten Kerne mit mehreren, kleineren Chromatinpartikeln im Kerninneren auf, wie sie auch an den Präparaten weiblicher Tiere beobachtet werden.

Tabelle 1. *Prozentuale Häufigkeiten des Geschlechtschromatins in den Buccalepithelzellkernen bei Mensch, Katze und Hund*

Art	Anzahl	Geschlecht	Häufigkeiten des Geschlechtschromatins in %
Mensch	12	♀	42,2 ± 1,42
Mensch	12	♂	0,0004 bis 0,62
Katze	11	♀	29,4 ± 1,30
Katze	3	♂	0,0017 bis 2,48
Hund	24	♀	45,8 ± 1,01
Hund	9	♂	0,038 bis 1,22

2. Hund. Auch bei den Hunden zeigte sich ein deutlicher Unterschied in den Ruhekernstrukturen der Epithelzellen weiblicher und männlicher Tiere. Die Ergebnisse, die wir an 24 weiblichen und 9 männlichen Individuen gewonnen haben, sind in Tabelle 1 wiedergegeben. Fast die Hälfte aller Kerne weist bei Hündinnen ein randständiges Chromatinkörperchen auf, während es bei Rüden nahezu nicht beobachtet wurde. Aus Abb. 3 ist ersichtlich, daß Gestalt und Größe des Geschlechtschromatins bei Hunden die gleiche Ausprägung wie beim Menschen zeigen.

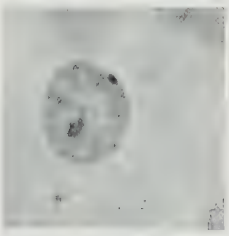


Abb. 2. *Katze*, weiblich

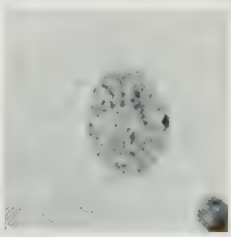


Abb. 3. *Hund*, weiblich

3. Pferd. Die Untersuchungen wurden an 13 Stuten und 10 Wallachen durchgeführt[1]. Bei beiden Geschlechtern besitzt der überwiegende Teil der Epithelzellkerne mehrere Chromatinkörperchen, so daß bei einer orientierenden Durchsicht ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Kernmorphologie nicht zutage

[1] KRUEGER und DIHLMANN (1957) stellten fest, daß sowohl Kastration als auch Hormongaben beim Kaninchen Zahl und Form der drumsticks nicht beeinflussen.

tritt. Bei einer genaueren Analyse der Epithelzellkerne beider Geschlechter lassen sich diese jedoch auf Grund unterschiedlicher Kernstrukturen in drei Typen einteilen. Auf dieser Grundlage wird ein Unterschied zwischen den Geschlechtern erkennbar.

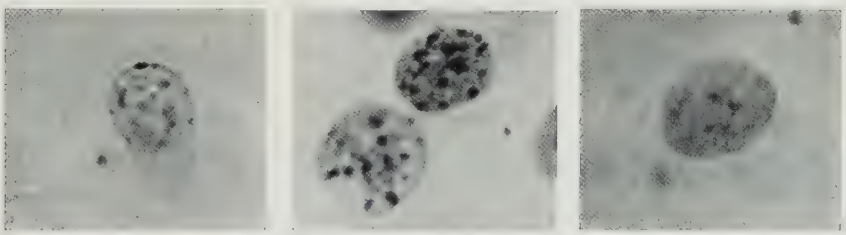
Folgende Kerntypen konnten gegeneinander abgegrenzt werden:

Typ I. Vorkommen eines einzigen, randständigen Chromatinkörpers, der die gleichen Eigenschaften (Färbbarkeit, Gestalt, Größe) wie das bei Mensch, Katze und Hund beobachtete Geschlechtschromatin aufweist.

Typ II. Mehrere Chromatinkörperchen, meistens 2—8, von unterschiedlicher Größe, an der Kernmembran oder im Kerninnern gelegen.

Typ III. Einheitliche Granulation ohne nennenswerte Chromatinstrukturen.

Ordnet man die Epithelzellkerne nach diesem Schema (Tabelle 2), so ergibt sich, daß in bezug auf den Typ I ein klarer Unterschied zwischen beiden Geschlechtern besteht: Kerne mit einem einzigen Chromatingebilde werden in Abstrichpräparaten von männlichen Tieren nie beobachtet, bei weiblichen Individuen



a b c

Abb. 4a—c. *Pferd*, a Typ I, b Typ II, c Typ III

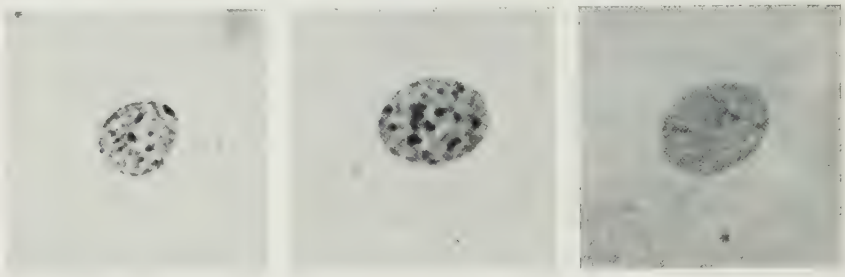
sind sie in einer Häufigkeit von rund 2% nachzuweisen. Die beiden anderen Kerntypen (II und III) werden dagegen in beiden Geschlechtern gefunden. Ihre Häufigkeiten differieren jedoch zwischen männlichem und weiblichem Geschlecht, und die Differenzen zeigen statistische Sicherung. Die drei verschiedenen Ruhekernstrukturtypen, die hier beobachtet werden, sind in Abb. 4 wiedergegeben.

Tabelle 2. *Prozentuale Häufigkeit der drei verschiedenen Typen von Buccalepithelzellkernen, aufgeteilt nach der Zahl der Chromatinkörper (mit einem: Typ I, mit mehreren: Typ II, ohne: Typ III) bei Pferd, Esel und Schwein*

Art	Anzahl	Geschlecht	Häufigkeiten der 3 Kerntypen in Prozent		
			I	II	III
Pferd	13	♀	2,1 ± 0,38	72,4 ± 1,23	25,5 ± 1,29
Pferd	10	♂	0	82,7 ± 1,19	17,3 ± 1,19
Esel	2	♀	2,5 ± 1,10	12,0 ± 2,24	85,5 ± 2,48
Esel	2	♂	0	9,5 ± 2,04	90,5 ± 2,0
Schwein	16	♀	1,8 ± 0,33	9,9 ± 0,74	86,9 ± 0,84
Schwein	12	♂	0	2,6 ± 0,46	97,2 ± 0,48
Schwein	1	♀	4	21	75

4. Esel. Zur Prüfung wurden zwei weibliche und zwei männliche Tiere herangezogen. Auch hier läßt eine erste Betrachtung der Präparate zwischen beiden Geschlechtern keinen Unterschied an den Ruhekernstrukturen erkennen. Aber die genaue Analyse der auswertbaren Kerne zeigt wiederum, daß die gleichen drei

morphologischen Gruppen wie beim Pferd aufstellbar sind und auf der Grundlage dieses „3 Typen-Schemas" einen Unterschied zeigen (Tabelle 2). Bei weiblichen Tieren ist auch hier in rund 2% ein randständiges, kompaktes Chromatingebilde nachweisbar, das die gleiche Ausprägung wie das Geschlechtschromatin des Menschen und der schon beschriebenen Haustiere erkennen läßt. In den von

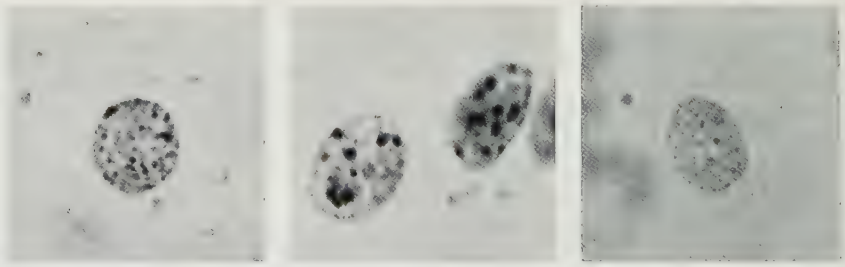


a b c

Abb. 5a—c. *Esel*, a Typ I, b Typ II, c Typ III

männlichen Tieren gewonnenen Abstrichpräparaten ist es dagegen nicht feststellbar. Auffallend gegenüber dem Pferd ist das umgekehrte Zahlenverhältnis von Kernen mit mehreren Chromatinkörpern zu denen ohne jegliche Chromozentrenausbildung. In der Abb. 5 sind die beim Esel beobachteten drei verschiedenen Ruhekerntypen wiedergegeben.

5. Schwein. Das Material stammte von 16 weiblichen und 12 männlichen Tieren sowie einem Zwitterschwein. Eine Überprüfung von 100 Kernen je Tier



a b c

Abb. 6a—c. *Schwein*, a Typ I, b Typ II, c Typ III

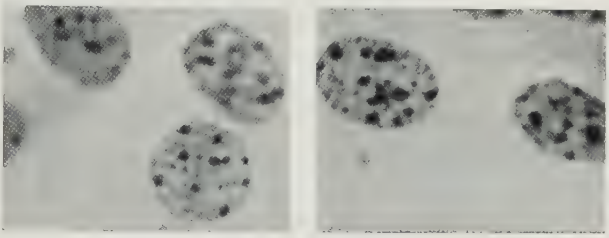
ergibt, daß eine Klassifizierung nach Kerntypen wie bei Pferd und Esel vorgenommen werden kann. Bei weiblichen Tieren ist wieder der Typ I in rund 2% vertreten, während er in den männlichen Präparaten nie gefunden wird. Die Mehrzahl der Kerne entfällt in beiden Geschlechtern auf die Gruppe von Typ III, während das Vorkommen von Kernen mit mehreren Chromatinkörpern (Typ II) relativ gering ist (Tabelle 2). Auch hier läßt sich wie beim Pferd hinsichtlich der beiden letztgenannten Kerntypen (II und III) statistisch ein Unterschied zwischen den Geschlechtern finden. In der Abb. 6 sind die bei Schweinen beobachteten Ruhekernstrukturen wiedergegeben.

An den Backenepithelzellkernen bei einem *Zwitterschwein* konnten die gleichen Feststellungen wie bei normalen weiblichen Schweinen getroffen werden[1]. Bei

[1] Über die Keimdrüsenverhältnisse konnten keine Untersuchungen angestellt werden.

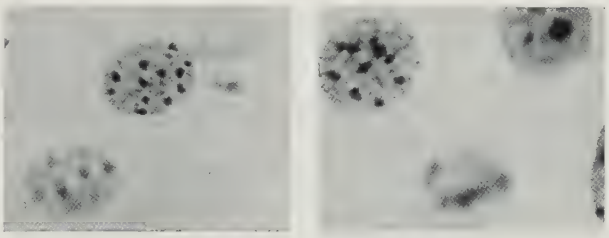
Auswertung von 100 Kernen entfallen 4 auf die Gruppe vom Typ I. Das hier beobachtete randständige Chromatingebilde zeigt ebenfalls die vom menschlichen Geschlechtschromatin her bekannte Ausprägung.

6. Rind. Die Untersuchungen wurden an 18 Kühen und 14 Bullen durchgeführt. In den Abstrichpräparaten beider Geschlechter traten im Vergleich mit den bisher besprochenen Haustieren starke Anhäufungen pyknotischer Kerne auf. Diese Erscheinung wird später diskutiert werden. Die auswertbaren Kerne weiblicher Tiere weisen eine Mehrzahl von Chromatinkörpern von unterschiedlicher Größe auf. Sie liegen sowohl randständig, wie auch ungleichmäßig verteilt im Kerninnern. Ruhekerne mit einem einzigen Chromozentrum von der gewohnten Größe und Gestalt des Geschlechtschromatins sind nicht nachweisbar. Bei der Betrachtung der männlichen Ruhekernstrukturen ergibt sich das gleiche Bild. Auch hier besitzen sämtliche zur Auswertung geeigneten Kerne mehrere dichte Chromatinkörperchen. Ein Unterschied in ihrem zahlenmäßigen Vorkommen zwischen beiden Geschlechtern ist nicht erkennbar, da von 3 bis zu 12 Chromatinkörpern alle Häufigkeiten sowohl in weiblichen als auch in männlichen Epithelzellkernen vertreten sind. Desgleichen kommen sehr selten in den Buccalabstrichpräparaten von Kühen wie von Bullen Ruhekerne ohne jegliche kompakte Chromatinstruktur vor (vgl. Abb. 7).



a b

Abb. 7a u. b. *Rind*, a weiblich, b männlich



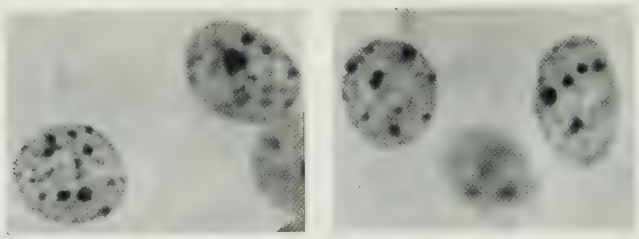
a b

Abb. 8a u. b. *Schaf*, a weiblich, b männlich

7. Schaf. Von 29 weiblichen und 31 männlichen Schafen zeigten die Ruhekerne in beiden Geschlechtern eine feinkörnige Grundstruktur, vorwiegend mit mehreren, größenmäßig oft unterschiedlichen, kompakten Chromatingebilden. Von ihnen liegt eins gelegentlich randständig. Weder in bezug auf diese randständigen Körper noch in bezug auf die Anzahl der weiteren Chromatinstrukturen läßt sich ein Unterschied zwischen den Geschlechtern erkennen. In ihrem Gesamtbild sind die Ruhekernstrukturen beim Schaf von denen des Rindes nicht zu unterscheiden, wie eine vergleichende Betrachtung der Abb. 7 und 8 zeigt.

8. Ziege. Das Untersuchungsmaterial stammte von zwei weiblichen und zwei männlichen Tieren. Es mußten jeweils größere Serien von Präparaten angefertigt werden, da nur sehr selten bewertbare Kerne zu finden sind. Die Analyse ergab, daß zwischen weiblichen und männlichen Buccalepithelzellkernen keine morphologischen Unterschiede an der Ruhekernstruktur auftreten. In beiden Geschlechtern werden neben Ruhekernen ohne prägnante Chromatingebilde solche

mit mehreren Chromatinkörperchen von variierender Größe und Zahl beobachtet (Abb. 9). Es ergibt sich das gleiche Bild, wie es für Rind und Schaf beschrieben wurde.



a b
Abb. 9a u. b. *Ziege*, a weiblich, b männlich

Diskussion

Unsere Frage, ob sich in den Buccalepithelzellkernen der Haustiere ein dem menschlichen Geschlechtschromatin vergleichbares Gebilde befindet, können wir für fünf der acht untersuchten Arten positiv beantworten. Bei Katze, Hund, Pferd, Esel und Schwein ist ein Chromatinkörper nachweisbar, der morphologisch (Größe, Gestalt und Lage) und histochemisch (feulgenpositiv) dem menschlichen Geschlechtschromatin entspricht. Da dieser Körper nur in den Ruhekernen weiblicher Tiere beobachtet wird, nicht jedoch im männlichen Geschlecht, erweist er sich zugleich als *geschlechtsspezifisches Merkmal* und kann auch hier als Geschlechtschromatin angesprochen werden. Während die beiden ersten Arten. Katze und Hund, ähnliche und zwischen den Geschlechtern ebenso klar abgrenzbare Häufigkeitsverhältnisse zeigen wie der Mensch, ist für die drei letztgenannten Arten, Pferd, Esel und Schwein, eine Diagnose wegen der Seltenheit dieses Gebildes erschwert. Unter den hier aufgefundenen drei verschiedenen Kerntypen ist es nur in 2% aller Kerne vorhanden (Typ I). Die beiden anderen Kerntypen, nämlich mit mehreren Chromatinkörpern (Typ II) und ohne deutliche Chromatinstrukturen (Typ III), zeigen zwischen den Geschlechtern bei zwei dieser drei Arten zwar auch schwache, statistisch schon abzusichernde Unterschiede, doch soll auf diesen Befund kein besonderes Gewicht gelegt werden. Bei Rind, Schaf und Ziege wurden zwar Chromatinkörperchen gefunden, gelegentlich auch in randständiger Lage, aber ein Unterschied zwischen den Geschlechtern ließ sich nicht ermitteln. Osuchowska und Suminski (1957) fanden im Inneren der Buccalepithelzellkerne am Rinde ebenfalls eine größere Zahl von Chromatingebilden bei beiden Geschlechtern. Ebenso wurde ein membranständiges Chromatinkörperchen bei beiden Geschlechtern festgestellt. Da die Autoren bezüglich dieses membranständigen Gebildes einen Häufigkeitsunterschied zwischen den Geschlechtern auszählen konnten, sprechen sie es als Geschlechtschromatin an.

Welche Erklärungsmöglichkeiten bieten sich für unsere Beobachtungen aus den bisher vorliegenden Untersuchungsergebnissen an? In älteren Arbeiten von Barr und Bertram (1949), Graham und Barr (1952), Crouch und Barr (1954). Klinger (1957), Reitalu (1957) u. a. wird das Geschlechtschromatinkörperchen der weiblichen Interphasekerne als Produkt der heteropyknotischen Abschnitte der beiden X-Chromosomen gedeutet, während man annahm, daß die heteropyknotischen Anteile der XY-Kombination in männlichen Kernen zu klein für

die Erfassung mit unseren optischen Hilfsmitteln seien. In jüngster Zeit konnten aber Ohno, Kaplan und Kinosita (1959) zeigen, daß es nur das eine X-Chromosom ist, das sich im weiblichen Ruhekern heteropyknotisch verhält und das Geschlechtschromatin bildet, während das zweite X isopyknotisch ist und sich nicht darstellt. Im männlichen Kern, der bei den Säugern ein X und ein Y enthält, ist das X-isopyknotisch, d. h. es bildet kein färbbares Körperchen. Damit wäre die Frage, warum es in männlichen Kernen nicht wenigstens zur Ausbildung eines Geschlechtschromatinkörperchens von der halben Größe des weiblichen kommt, beantwortet. Dagegen bleibt die Frage offen, weshalb das Geschlechtschromatin weiblicher Individuen nicht in allen Geweben auftritt und in den positiven Geweben so gut wie niemals in sämtlichen Zellen. Aus diesen und einigen anderen Gründen lehnen Hienz (1957), Hertl (1957), Segal und Nelson (1957) die Barrsche Hypothese ab. Hienz deutet das Geschlechtschromatinkörperchen nicht als einen Chromosomenabkömmling, sondern als ein Stoffwechselprodukt im Gefolge geschlechtsunterschiedlicher Stoffwechselvorgänge. Diese Annahme dürfte heute nur von wenigen Autoren geteilt werden. Eine andere Frage ist es, ob und wieweit Stoffwechselprozesse das Verhalten heterochromatischer Chromosomen oder Chromosomenabschnitte bei der Ruhekernbildung beeinflussen können. Beispiele sprechen für solche Möglichkeiten.

Bei Betrachtung unserer Befunde bei Pferd, Esel und Schwein könnte man annehmen, daß die auffällig niedrigen Prozentsätze erkennbarer geschlechtschromatin-positiver Buccalepithelzellen bei diesen Pflanzenfressern darauf beruhen, daß der höhere pH-Wert in der Mundhöhle auf die Chromozentrenbildung autosomalen Heterochromatins begünstigend wirkt, so daß der Nachweis des Geschlechtschromatins nicht mehr möglich ist.

Auf Einflüsse stoffwechselphysiologischer Faktoren weisen Beobachtungen von Hinrichsen (1957) hin, der bei Zellen mit stark vermehrter Eiweißsynthese im Pankreas des Kaninchens außer dem Geschlechtschromatin mehrere andere Chromatingebilde fand, welche die Geschlechtsdiagnose erschwerten. Ein weiteres Beispiel für die Beziehungen zwischen Zellhaushalt und dem Verhalten heterochromatischer Gebilde war bereits den älteren Cytologen bekannt: bei der fleischfressenden Pflanze *Drosera* vergrößern sich nach der Fütterung die Chromozentren. Vielleicht gehört hierher auch der Befund, daß bei Hühnern, bei denen das weibliche Geschlecht das heterogametische ist, sich das X-Chromosom der weiblichen Kerne trotzdem heteropyknotisch verhält und ein Geschlechtschromatinkörperchen bildet, während es im männlichen Geschlecht mit seinen zwei X-Chromosomen nicht gefunden wird (Kosin und Ishizaki 1959; Ohno, Kaplan und Kinosita 1960).

Bezüglich unserer Befunde in der Gruppe Rind, Schaf und Ziege, die in den Buccalepithelien keinen Geschlechtsunterschied erkennen lassen, möchten wir dagegen morphologische Faktoren in den Vordergrund der Deutung stellen. Es handelt sich hier um Wiederkäuer, bei denen die Buccalepithelien mit einem Stratum corneum versehen sind. Sachs und Danon (1956) haben an der menschlichen Epidermis nachgewiesen, daß die Zellschichten der Verhornungszone wegen des Vorkommens zahlreicher Chromatingebilde im Kernraum für eine Geschlechtsdiagnose ungeeignet sind. Da die Backenschleimhaut der Wiederkäuer den gleichen Aufbau wie die menschliche Epidermis besitzt, nehmen wir

an, daß bei den Buccalabstrichen nur Kerne dieser verhornenden Zellschicht erhalten werden, deren multiple Chromatinkörper einen Geschlechtschromatinnachweis verhindern. Als Ursache dieser Körper vermuten wir degenerative Zellveränderungen.

Betrachtet man unsere an Haustieren gewonnenen Ergebnisse in bezug auf deren systematische Stellung, so zeigt sich, daß bei Katze und Hund, die zur Ordnung der Carnivoren gehören, eine Übereinstimmung im Hinblick auf das Vorhandensein eines geschlechtsspezifischen Chromatinkörpers besteht. Bei den übrigen Haustieren, die sämtlich der Ordnung der Ungulaten zugeordnet werden, läßt sich eine Übereinstimmung bei Pferd und Esel erkennen, die der Unterordnung der Perissodactyla angehören. Schwein, Rind, Schaf und Ziege werden der Unterordnung der Artiodactyla zugeteilt. Diese gliedert sich in die Sektionen der Ruminantia und Nonruminantia. Rind, Schaf und Ziege, die in die erstgenannte Sektion eingereiht werden, zeigen ein einheitliches Verhalten. An ihnen ist eine kernmorphologische Geschlechtsdiagnose nicht durchführbar. Das Schwein, das der Sektion der Nonruminantia zugeordnet wird, weicht in seinem kernmorphologischen Verhalten von den Angehörigen der anderen Sektion ab. Es zeigt aber unerwartet Übereinstimmungen mit Pferd und Esel, die zu einer anderen Unterordnung gehören.

Abschließend läßt sich zur Frage der unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich einer strukturellen Geschlechtsdifferenz in den Buccalepithelien der von uns untersuchten Säugern sagen, daß sowohl gewebsspezifische physiologische Bedingungen wie morphologische Faktoren (verhornendes Epithel bei den Wiederkäuern) zur Erklärung herangezogen werden können. Durch sie mögen vorhandene Unterschiede verschleiert oder maskiert werden. Eine solche Maskierung durch geschlechtsunspezifische Chromatinkörper vermuten wie bei jenen drei Arten, an denen sich ein Geschlechtsunterschied nicht ermitteln ließ. Keinesfalls nehmen wir an, daß ein solcher Unterschied hier fehlt. Soweit andere Gewebe bei diesen Arten bereits untersucht wurden, trat eine Geschlechtsspezifität zutage (Rind, Schaf) (vgl. Schmidtke 1957).

Für eine weitere Klärung wäre die Prüfung der chromosomalen Verhältnisse unter Anwendung jener verbesserten Methoden angezeigt, wie sie jetzt beim Menschen angewendet werden. Über die Verhaltensweisen des Heterochromatins sind aber hieraus zur Zeit keine Aufschlüsse zu erwarten. Dafür müßten vor allem Insektenstudien herangezogen werden (Wolf 1957), wenn es um die Frage der Beeinflußbarkeit des Allozykliegrades der Chromosomen geht.

Zusammenfassung

Die Epithelzellkerne der Backenschleimhaut von Katze, Hund, Pferd, Esel, Schwein, Rind, Schaf und Ziege wurden auf einen kernmorphologischen Geschlechtsdimorphismus geprüft.

Ein geschlechtsspezifisches Chromatingebilde konnte bei weiblichen Katzen mit einer Häufigkeit von 29,4% ± 1,30% und bei weiblichen Hunden von 45,8% ± 1,01% nachgewiesen werden. Der Mutungsbereich bei männlichen Katzen erstreckt sich von 0,0017% bis 2,48% und bei männlichen Hunden von 0,038% bis 1,22%.

Bei Pferd, Esel und Schwein treten in beiden Geschlechtern multiple, größere Chromatinkörper in den Epithelzellkernen auf. Jedoch finden sich bei den weiblichen Vertretern, wenn auch in geringer Häufigkeit, Kerne mit einem dem menschlichen Geschlechtschromatin vergleichbaren Gebilde und zwar bei Schweinen in 1,8% ± 0,33%, bei Pferden in 2,1% ± 0,38% und bei Eseln in 2,5% ± 1,10%, während sie bei männlichen Individuen völlig fehlen.

Bei Rind, Schaf und Ziege treten in beiden Geschlechtern mehrere, kompakte Chromatinkörper auf. Ein Geschlechtsunterschied mit Hilfe des Buccaltests ist bei diesen Arten nicht zu ermitteln.

Natur und Beeinflußbarkeit der geschlechtsspezifischen Ruhekernstruktur werden diskutiert.

Literatur

Barr, M. L., and E. Bertram: A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nuclear satellit during accelerated nucleoprotein synthesis. Nature (Lond.) **163**, 676—677 (1949).

Crouch, Y. F., and M. L. Barr: The behaviour of the sex chromatin during axon reaction. J. Neuropath. exp. Neurol. **13**, 353—358 (1954).

Davidson, W. M., and D. R. Smith: A morphological difference in the polymorphnuclear neutrophil leucocytes. Brit. med. J. **1954II**, 6—7.

Graham, M. A., and M. L. Barr: A sex difference in the morphology of metabolic nuclei in somatic cells of the cat. Anat. Rec. **112**, 709—723 (1952).

Hertl, M.: Zum Nucleolus-Problem. Z. Zellforsch. **46**, 18—51 (1957).

Hienz, H. A.: Zellkernmorphologische Geschlechtserkennung bei Säugetier und Mensch. Dtsch. med. Wschr. **82**, 1986—1991 (1957).

— Die zellkernmorphologische Geschlechtserkennung in Theorie und Praxis. Heidelberg: Dr. A. Hüthig-Verlag 1957.

Hinrichsen, K.: Cytologische Geschlechtsbestimmung an somatischen Zellen von Kaninchen. Verh. Anat. Ges., 54. Verslg 1957, S. 287—293.

Klinger, H. P.: The chromatin in fetal and maternal portions of the human placenta. Acta anat. (Basel) **30**, 371—397 (1957).

— The fine structure of the sex chromatin body. Exp. Cell. Res. **14**, 207—211 (1957).

—, and K. S. Ludwig: A universal stain for the sex chromatin body. Stain Technol. **32**, 235—244 (1957).

Kosin, I. L., and H. Ishizaki: Incidence of sex chromatin in *Gallus domesticus*. Science **130**, 43—44 (1959).

Krueger, W., u. W. Dihlmann: Über das Verhalten geschlechtsspezifischer Kernanhänge nach Kastration. Klin. Wschr. **35**, 1047—1048 (1957).

Ludwig, K. S.: Eine vereinfachte Färbungsmethode zur Darstellung des Geschlechtschromatins. Med. Wschr. **101**, 342—343 (1959).

Lüers, Th.: Ein morphologisches Geschlechtsmerkmal in Leukocyten. Berl. Med. **7**, 120—121 (1956).

—, u. H. Lüers: Vergleichende Untersuchungen zur Geschlechtsdiagnose aus den neutrophilen Leukocyten bei einigen Laboratoriumsnagern. Zool. Anz. **160**, 248—260 (1958).

—, u. E. Struck: Untersuchungen zur geschlechtsspezifischen Struktur der Neutrophilenkerne bei einigen Haustieren (Ziege, Schaf, Schwein, unter Berücksichtigung der Zwitter). Zool. Anz. **164**, 89—103 (1960).

Ohno, S., W. D. Kaplan and R. Kinosita: Formation of the sex chromatin by a single X-chromosome in liver cells of *Rattus norwegicus*. Exp. Cell Res. **18**, 415—418 (1959).

— — — On the sex chromatin of *Gallus domesticus*. Exp. Cell Res. **19**, 180—183 (1960).

Osuchowska, Z., and E. Suminski: Sex difference in the structure of somatic cells nuclei in cattle. Folia morph. (Warszawa) **8**, 195—199 (1957).

Reitalu, J.: Observations on the so-called sex chromatin in man. Acta Genet. med. (Roma) **6**, 393—402 (1957).

Sachs, L., and M. Danon: The diagnosis of the sex chromatin in human tissues. Genetica **28**, 201—216 (1956).

Schleyer, F.: Beziehungen der Nachweisbarkeit des Geschlechtschromatins in den Oberhautzellen und dem Leichenalter. Schweiz. Z. allg. Path. **20**, 280—286 (1957).

Schmidtke, C.: Über karyologische Geschlechtsdifferenzierung bei Tieren. Tierz. Züchtungsbiol. **70**, 203—232 (1957).

Segal, S. J., and W. O. Nelson: Developmental aspects of human hermaphroditism: the significance of sex chromatin patterns. J. clin. Endocr. **17**, 676—692 (1957).

Stevens, W. L.: Accuracy of mutation rates. J. Genet. **43**, 301—307 (1942).

Wolf, B. E.: Temperaturabhängige Allozyklie des polytänen X-Chromosoms in den Kernen der Somazellen von *Phryne cincta*. Chromosoma (Berl.) 8, 396—435 (1957).

Dr. Eva Struck,
Institut für Genetik der Freien Universität Berlin,
Berlin-Dahlem, Rudeloffweg 9

Zeitschrift für Zellforschung 55, 673—678 (1961)

Aus dem Max Planck-Institut für Hirnforschung, Abteilung für Tumorforschung
und experimentelle Pathologie (Direktor: Prof. Dr. W. Tönnis)
und der Universitäts-Augenklinik Köln (Direktor: Prof. Dr. K. vom Hofe)

HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE CHOLINESTERASEN IN DER MENSCHLICHEN NETZHAUT

Von

G. Viale* und G. Apponi**

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 13. Juli 1961)

Die Untersuchungen der letzten Jahre über die topische Verteilung der Cholinesterasen in der Netzhaut verschiedener Tierspezies führten zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen und zu widersprechenden Darlegungen über die Rolle dieser Enzyme in diesem Gewebe. Die früher mit biochemischer Technik erzielten Ergebnisse zum Nachweis der Cholinesterasen (Weber und Escher 1939, Anfinsen 1944, Weekers 1946) konnten durch die Einführung histochemischer Untersuchungsmethoden nicht nur bestätigt, sondern auch bezüglich einer genaueren Lokalisation des Fermentvorkommens erweitert werden.

Koelle und Friedenwald (1950) erhielten mit Hilfe ihrer Thiocholintechnik an in toto bebrüteten Netzhautstückchen von Rattenaugen eine positive Darstellung in der inneren Körner- und plexiformen Schicht. Bei einer weiteren differenzierteren Untersuchung dieser Autoren in Zusammenarbeit mit Wolfand und Allen (1952) an der Katze konnten sie nun angeben, daß es sich bei den reagierenden Elementen vor allem um Azetylcholinesterasen (AChE) in amakrinen Zellen handelt.

Durch vergleichende Untersuchungen an ebenfalls in toto bebrüteten Netzhautstückchen kam Francis (1953) zu dem Ergebnis, daß AChE bei den Säugetieren nur in der inneren plexiformen Schicht vorhanden ist, während bei niederen Wirbeltieren auch in der äußeren plexiformen Schicht der Retina eine deutlich positive Reaktion auftritt. Durch Verwendung von Gefrierschnitten kamen Hebb, Silva und Walsh (1953) an Kaninchennetzhaut zu dem Ergebnis, daß die Reaktivität viel ausgedehnter ist und auch noch die multipolaren und bipolaren Zellen umfaßt; mit der Bezeichnung multipolare und bipolare Zellen scheinen diese Autoren auf alle in der inneren Körnerschicht befindlichen Zellelemente hinweisen zu wollen. Sie fanden sowohl eine allgemeine positive Reaktion für spezifische AChE, wie im besonderen eine Anfärbung der Zellkerne, die durch das Vorkommen von unspezifischer Cholinersterase (ChE) bedingt sein soll. Wislocki und Sidman (1954) stellten an den Schnitten von Frosch- und Makakonetzhaut bei ihren Untersuchungen über unspezifische Esterasen eine Reaktion in Höhe der plexiformen Schichten und im innersten Teil der Sinneszellen fest. An der Froschnetzhaut beobachteten auch Shen, Greenfield und Boell (1956) eine Cholinesterase-Aktivität in beiden plexiformen Schichten. Untersuchungen an verschiedenen Stadien von Hühnerkeimen ergaben eine Aktivität an den multipolaren, amakrinen und horizontalen Zellen, am Myoid der Zäpfchen und an der inneren plexiformen Schicht. Leplat und Gerebtzoff (1956) erhielten an der Netzhaut der Katze und des Kaninchens lediglich im Bereich der inneren plexiformen Schicht ein positives Ergebnis für AChE. Beim Pferd entdeckte Eichner (1955) einen positiven Reaktionsausfall zwischen der inneren plexiformen und der inneren Körnerschicht. Weitere Untersuchungen an der Netzhaut des Menschen führten ihn zu der Feststellung, daß auch im Gebiet der Innenglieder an der äußeren Grenzmembran, an den

* Assistent an der Neurochirurgischen Klinik der Universität Genua, s. Z. Stipendiat der Max Planck-Gesellschaft.

** Assistent an der Universitäts-Augenklinik Neapel.

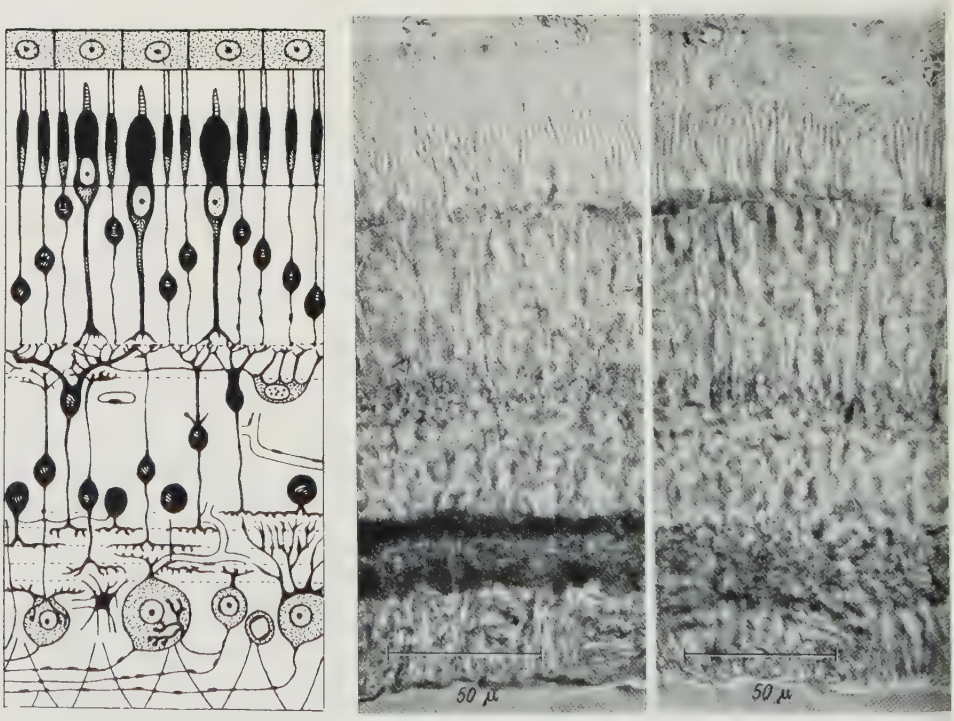
Henleschen Fasern und den Endfüßen der Sinneszellen eine positive Reaktion auftritt (Eichner 1956—1958). Vergleichende Untersuchungen über die Cholinesterasen bei verschiedenen Tierspezies wurden in neuerer Zeit von Capurro, Zaccheo und Viale (1958, 1959) durchgeführt. Hiernach läßt sich eine Aktivität vor allem in den mehr inneren Schichten nachweisen. Aber nicht nur hier, sondern auch im Gebiet der äußeren Schichten kommt es bei einigen Tierspezies, nicht nur bei den niederen Wirbeltieren, zu einem positiven Reaktionsausfall. In der Retina von Feten und Neugeborenen fanden Raviola und Raviola (1960) positive Azetylcholinesterase-Aktivität lediglich im Bereich der inneren plexiformen Schicht.

Material und Technik

Untersucht wurden Netzhäute enucleierter menschlicher Augen. Wir isolierten Netzhautstückchen, die nicht mit dem pathologisch veränderten Retinaabschnitt in Zusammenhang standen, sofort nach der Entnahme in einer physiologischen NaCl-Lösung und legten sie in 10%ige neutrale Formalinlösung für 1 Std bei 4° C ein. An Gefrierschnitten wurde die Thiocholintechnik nach Gerebtzoff (1956) durchgeführt. Die Bebrütungsdauer betrug bei 38° C und einem p_H 6,2 von 5 90 min. Als Inhibitoren benutzten wir DFP, E 605 und Eserin. Zur Orientierung dienten Schnitte, die mit den üblichen histologischen Methoden gefärbt waren.

Befunde

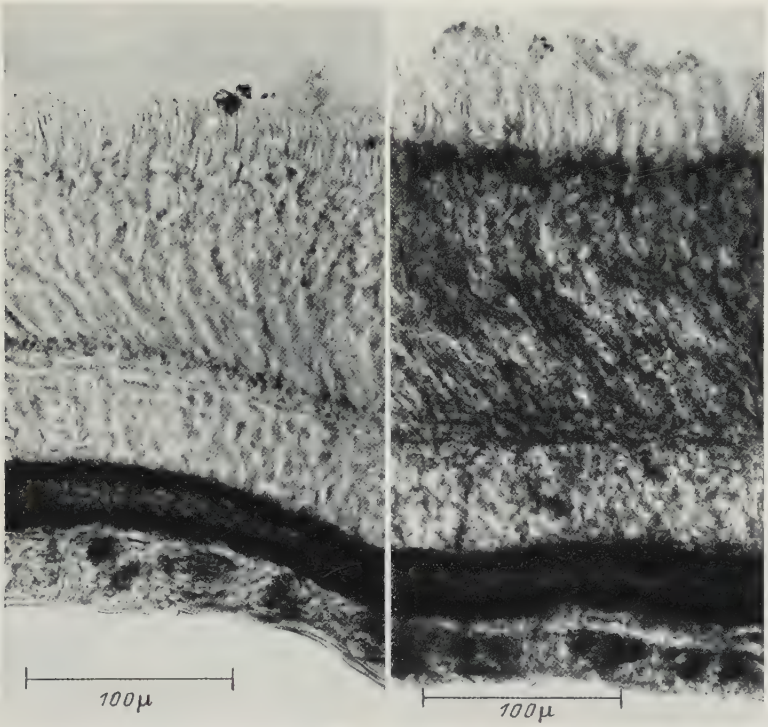
Die innere Grenzmembran der Netzhaut erscheint reaktionslos. Gelegentlich findet man sowohl hinsichtlich der Qualität des Enzyms wie der Frequenz eine



a b

Abb. 1a u. b. Menschliche Retina. Inkubation mit Azetylthiocholin (a) und mit Butyrylthiocholin (b) 20 min. (Das beigefügte Schema stammt aus Clara, 1942)

inkonstante Reaktion im Bereich der Nervenfasern; meist ist dieser Reaktionsausfall in den unmittelbar peripapillären Netzhautteilen festzustellen. Ein positives Ergebnis lassen die Ganglienzellen erkennen. Im wesentlichen zeigt sich



a b

Abb. 2 a u. b. Menschliche Retina, peripapilläre Zone. Inkubation mit Azetylthiocholin bei a 50 min, bei b 90 min

eine enzymatische Aktivität am Perikaryon, während die Dendriten nur leicht positiv reagieren; überwiegend handelt es sich hierbei um AChE. (Abb. 1 u. 2).

Den intensivsten Reaktionsausfall finden wir in der inneren plexiformen Schicht. Besonders ausgeprägt ist die Reaktion an den Außenrändern dieser Schicht, wo sie einerseits mit den multipolaren, andererseits mit den bipolaren und amakrinen Zellen in Berührung steht. Auf diese Weise entsteht das charakteristische Bild von zwei intensiv angefärbten, parallel verlaufenden Schichten, die durch einen weniger hervortretenden Streifen getrennt werden. Sehr wahrscheinlich ist dies auf den horizontalen Verlauf der Zellfortsätze, die hier

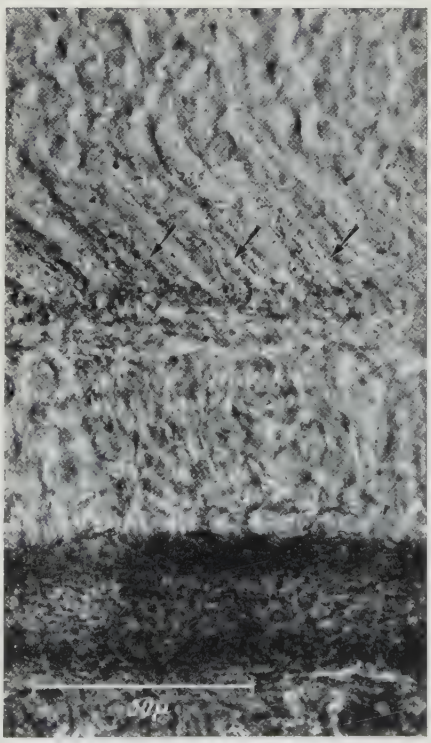


Abb. 3. Stärker vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 2a. Positive Reaktion der Henleschen Fasern (↑)

synaptische Verbindungen eingehen, und vor allem der amakrinen Zellen zurückzuführen, deren horizontale Endigungen schichtweise liegen. Bei dem Enzym handelt es sich vorwiegend um spezifische AChE, doch sind auch noch Spuren von unspezifischer Cholinesterase vorhanden.

Die innere Körnerschicht bleibt im wesentlichen negativ. Eine geringe Reaktivität läßt sich nur nach verhältnismäßig langer Inkubationszeit feststellen. Allerdings ist die Möglichkeit nicht auszuschließen, daß es sich hierbei um Diffusionsphänomene handelt.

AChE und ChE sind in der äußeren plexiformen Schicht vorhanden. Auch hier sind die Reaktionsprodukte in zwei parallelen Schichten angeordnet, was wiederum mit der horizontalen Anordnung der Zellen und ihrer Fortsätze in Zusammenhang stehen dürfte. Diese Schichtung ist sowohl für die innere wie für die äußere Schicht nur bei Verwendung von Acetylthiocholin festzustellen. Wegen der Anwendung von Inhibitoren ist an der Spezifität des Reaktionsausfalles nicht zu zweifeln. Wie schon angegeben, ist ChE in diesen beiden Schichten nur in Spuren nachzuweisen. Besonders intensiv fällt die Reaktion in den Henleschen Fasern und in den Endfüßen der Sinneszellen aus (Abb. 3). Auch hier sind beide Enzymarten vorhanden. Die äußere Körnerschicht bleibt negativ. Die der äußeren Grenzmembran anliegenden Innenglieder der Sehzellen erweisen sich als ChE-positiv, die äußeren Teile der Zäpfchen und Stäbchen sind völlig negativ.

Die plexiformen Schichten ergeben bereits nach 10—20 min Inkubation eine positive Reaktion. Die Darstellung der übrigen Schichten erfordert längere Inkubationszeiten.

Besprechung

Unsere Ergebnisse bestätigen die Befunde von Eichner (l.c.). Auch wir konnten nachweisen, daß die Cholinesterase-Aktivität in der menschlichen Netzhaut sehr stark ist. Die drei Zelltypen, welche die primären Sehwege bilden, enthalten histochemisch nachweisbare Cholinesterase. Eine positive Reaktion ergeben die Sinneszellen, besonders in ihren Endfüßen und in den Verzweigungen, die sich in der äußeren plexiformen Schicht ausbreiten. Eine gleich starke Reaktion zeigen die Henleschen Fasern. Das Zytoplasma der bipolaren Zellen verhält sich im wesentlichen negativ. Eine Reaktivität ist jedoch in Höhe der beiden plexiformen Schichten vorhanden, in deren Gebiet die Synapsen dieser Neurone liegen. An den multipolaren Zellen läßt sich eine deutliche zytoplasmatische Reaktion feststellen. Die kurzläufigen, die horizontalen und amakrinen Zellen scheinen, wenigstens beim Menschen, keine Reaktionen zu geben. Ebenso sind die Müllerschen Zellen negativ. Von besonderer Bedeutung scheint die Aktivität in den äußersten Schichten und besonders in der äußeren plexiformen Schicht zu sein.

Nach den Vorstellungen von Feldberg und Vogt (1948) erfolgt die Übertragung eines Impulses durch eine nicht cholinergische Substanz. Leplat und Gerebtzoff (1956 und 1959) sehen in dem positiven Ausfall einer besonderen Reaktion, nämlich der Polymerisation von Phenolen, eine Bestätigung der Feldbergschen Theorie.

Abgesehen davon, daß die kurzläufigen Neurone, die horizontalen und amakrinen Zellen nur schwer in das System alternierender Stationen einzuordnen sind, zeigt der positive Reaktionsausfall in der äußeren plexiformen Schicht nicht nur der niederen Wirbeltiere, sondern auch der Säugetiere, insbesondere des Menschen,

daß auch in der Physiologie der Sinneszellen ein cholinergisches System mitwirkt. Sicherlich bestehen quantitative Unterschiede zwischen den beiden plexiformen Schichten. Außerdem spielen die besonderen funktionellen Bedingungen bei den verschiedenen Tierspezies sehr wahrscheinlich eine nicht zu vernachlässigende Rolle für den Reaktionsausfall. So konnten z. B. Yoshida (1958) sowie Capurro, Zaccheo und Viale (1959) eine Veränderung der Cholinesterase-Aktivität bei unterschiedlicher Lichtreizung feststellen. Ferner ist in Betracht zu ziehen, daß die Reaktionsintensität vom Reichtum der Nervenverzweigungen in allen plexiformen Schichten abhängt, wenn man sich Pope (1952) anschließt, wonach eine direkte Beziehung zwischen dem Vorkommen von Cholinesterase und der Komplexität der Nervenverzweigungen besteht. Nach einer persönlichen Mitteilung Eichners scheint aber nicht nur eine bestimmte Beziehung zwischen der Menge des Cholinesterase-Vorkommens und der Sehfunktion zu bestehen, sondern auch das Alter die enzymatische Aktivität zu beeinflussen. Nachmanson u. Mitarb. (1941, 1946) konnten zeigen, daß zwischen dem Cholinesterase-Vorkommen und der elektrischen Aktivität ein festes Verhältnis besteht. Tomita und Funaishi (1952) entdeckten mit Mikroelektroden eine besonders intensive elektrische Aktivität in den inneren Schichten der Netzhaut; ihr entspricht das reichliche Vorkommen von Cholinesterase in dieser Lokalisation.

Der positive Ausfall der Cholinesterase-Reaktion in der äußeren plexiformen Schicht legt die Vorstellung nahe, daß es sich hier wie in der inneren plexiformen Schicht um ein cholinergisches System handelt. Ein negativer Ausfall der histochemischen Reaktion spricht unseres Erachtens nicht gegen diese Hypothese, da der Enzymgehalt unter der Empfindlichkeit der zur Verfügung stehenden Methoden liegt, zumal in Anbetracht der sehr hohen Zahl von „Turnovers" der enzymatischen Reaktion (4 Mio nach Nachmanson u. Mitarb. 1946). Die widersprechenden Angaben in der Literatur lassen sich mit großer Wahrscheinlichkeit aber auch noch auf unterschiedliche Handhabung der Methodik zurückführen. So können wir z. B. die Erfahrung von Hebb u. Mitarb. (1953) vollauf bestätigen, daß bei der Bebrütung von Netzhautstückchen in toto nicht alle Cholinesterasen dargestellt werden. Was die Art des Enzyms betrifft, so ist in beinahe allen positiven Schichten eine Mischung von ChEN vorhanden, wobei AChE in den plexiformen Schichten vorherrscht.

Zusammenfassung

Mit der Thiocholin-Methode wird die Lokalisation der Cholinesterasen (AChE und ChE) in der Retina des Menschen (Operationsmaterial) untersucht. Auch beim Menschen ist das Enzym in den äußeren Schichten vorhanden. Dies trifft vor allem für die äußere plexiforme Schicht zu, die von den Synapsen zwischen den Sehzellen und den bipolaren Zellen gebildet wird. Es wird versucht, die histochemischen Befunde mit den derzeitigen physiologischen Vorstellungen über die Erregungsübertragung in der Netzhaut in Einklang zu bringen.

Literatur

Anfinsen, C. B.: The distribution of cholinesterase in the bovine retina. J. biol. Chem. **152**, 267—278 (1944).

Boell, E. J., P. Greenfield and S. C. Shen: Development of cholinesterase in the optic lobes of the frog (Rana pipiens). J. exp. Zool. **129**, 415—452 (1955).

Capurro, S., D. Zaccheo et G. Viale: Études histochimiques sur les cholinestérases de la rétine des mammifères. C.R. Ass. Anat. **45**, 272—276 (1958).
— — — Ricerche di istochimica enzimatica sulla retina. 1. Congr. Soc. Ital. di Istochim., Messina, 1958.
— — — Ricerche istochimiche sulla attività colinesterasica nella retina di rettili. Boll. Soc. Ital. Biol. sper. **35**, 609—610 (1959).
— — — Studio dell'attività colinesterasica nella retina in rapporto al riposo visivo e agli stimoli luminosi. Boll. Soc. Ital. Biol. sper. **35**, 611—613 (1959).
— — — Ricerche istochimiche sull'attività colinesterasica nella retina di uccelli. 2. Congr. Soc. Ital. di Istochim., Firenze, 1959.
Clara, M.: Das Nervensystem des Menschen, 1. Aufl. Leipzig: Johann Ambrosius Barth 1942.
Eichner, D.: Zur Frage der Fermentlokalisation in der Netzhaut des Rindes. Z. Zellforsch. **41**, 493—508 (1955).
— Zur Topochemie der Netzhaut. Klin. Mbl. Augenheilk. **23**, 29—35 (1955).
— Zur Frage der Fermentlokalisation in der Netzhaut des Menschen. Z. Zellforsch. **43**, 339—344 (1956).
— Über Histologie und Topochemie der Sehschicht in der Netzhaut des Menschen. Z. mikr.-anat. Forsch. **63**, 82—93 (1957).
— Zur Histologie und Topochemie der Netzhaut des Menschen. Z. Zellforsch. **48**, 137—186 (1958).
Feldberg, W., and M. Vogt: Acetylcholine synthesis in different regions of the central nervous system. J. Physiol (Lond.) **107**, 372—381 (1948).
Francis, C. M.: Cholinesterase in the retina. J. Physiol. (Lond.) **120**, 435—439 (1953).
Gerebtzoff, M. A.: Cholinesterases. London: Pergamon Press 1959.
Hebb, C. O., A. Silver, A. A. B. Swann and E. G. Walsh: A histochemical study of cholinesterases of rabbit retina and optic nerve. Quart. J. exp. Physiol. **38**, 185—191 (1953).
Koelle, G. B., and J. S. Friedenwald: The histochemical localization of cholinesterase in ocular tissues. Amer. J. Ophthal. **33**, 253—256 (1950).
— L. Wolfand, J. S. Friedenwald and R. A. Allen: Localization of specific cholinesterase in ocular tissues of the cat. Amer. J. Ophtal. **35**, 1580—1584 (1952).
Leplat, G., et M. A. Gerebtzoff: Localization de l'acetylcholinestérase et des médiateurs diphénoliques dans la rétine. Ann. Oculist. (Paris) **189**, 121—128 (1956).
Nachmansohn, D., C. W. Coates and M. A. Rothemberg: Studies on cholinesterase. II. Enzyme activity and voltage of the action potential in electric tissue. J. biol. Chem. **163**, 39—48 (1946).
—, and B. Meyerhof: Relation between electrical changes during nerve activity and concentration of cholinesterase. J. Neurophysiol. **4**, 348—361 (1941).
Pope, A.: Quantitative distribution of dipeptidase and acetylcholine esterase in architectonic layers of rat cerebral cortex. J. Neurophysiol. **15**, 115—130 (1952).
Raviola, E., et G. Raviola: Recherches histochimiques sur la rétine de lapin au cours de son développement post-natal. II. Groupes-SH et activité acetylcholinesterasique. 1. Congr. Internat. Histochimie Cytochimie. Paris, 1960.
Shen, C. C., P. Greenfield and E. J. Boell: Localization of acetylcholinesterase in chick retina during histogenesis. J. comp. Neurol. **106**, 433—452 (1956).
Tomita, T., and A. Funaishi: Studies on intraretinal action potential with low-resistence microelectrode. J. Neurophysiol. **15**, 75—84 (1952).
Weekers, R.: La cholinestérase de la rétine. C.R. Soc. Biol. (Paris) **140**, 567—570 (1946).
Wever, H. J. M., u. F. P. Fischer: Über den Azetylcholinesterase-Gehalt der subretinalen Flüssigkeit bei rupturellen Netzhautablösungen. Ophtalmologica (Basel) **96**, 348—354 (1939).
Wislocki, G. B., and R. L. Sidman: The chemical morphology of the retina. J. comp. Neurol. **101**, 53—99 (1954).
Yoshida, M.: Acetylcholine-hydrolizing enzyme in the isolated inner and outer segments of the receptor cell of frog retina. Jap. J. Physiol. 8, 155—159 (1958).

Dr. G. Viale,
Genua (Italien), Neurochirurg. Universitätsklinik
Dr. G. Apponi, Universitätsaugenklinik,
Köln-Lindenthal, Lindenburg

Zeitschrift für Zellforschung 55, 679—695 (1961)

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Hamburg
(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Horstmann)

VERGLEICHENDE STUDIEN ÜBER BAU UND FUNKTION DES AMNIONS. DAS SÄUGERAMNION AM BEISPIEL DES GÜRTELTIERAMNIONS *(DASYPUS NOVEMCINCTUS)*

Von

Ursula von dem Bussche-Haddenhausen*

Mit 13 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. Juli 1961)

A. Einleitung

Seit 1953 haben H. Bautzmann u. Mitarb. Untersuchungen über Bau und Funktion des Amnions verschiedener Sauropsiden, Säuger und des Menschen durchgeführt. Hierbei interessierte vor allem das morphologische Substrat und die Physiologie der Fruchtwasserbildung, sowie das Problem der Förderung der Fruchtwasserzirkulation durch „Embryokinese" und „Amnionmotorik". Glatte und nicht innervierte (!) Muskelzellen, die den „Motor" von Amnionpulsationen darstellen, wurden bisher nur im Amnion der untersuchten Vögel und Reptilien gefunden (H. Bautzmann 1956, H. Bautzmann und R. Schröder 1953, 1955, 1956, H. Bautzmann und Ch. Hertenstein 1957). Im Amnion der untersuchten Säuger und des Menschen sind sie nicht vorhanden. Dieses Muskelnetz muß an irgendeiner Stelle der stammesgeschichtlichen Entwicklung der Säugetiere geschwunden sein.

Um einen weiteren Einblick in die Phylogenese des Säugeramnions zu gewinnen, wurden die Untersuchungen von H. Bautzmann und Ch. Hertenstein (1957) am Amnion primitiver Säuger mit Beobachtungen am Amnion von *Dasypus novemcinctus* fortgeführt.

Dieses Gürteltier gehört zur Ordnung der Edentata Xenarthra (C. Grobben 1917), deren Phylogenese mit dem Tertiär im wesentlichen beendet war (Thenius und Hofer 1960). Es ist also ein Vertreter einer relativ archaisch gebliebenen Form der Säugetiere. Das Weibchen entwickelt in seinem Uterus simplex während einer Tragzeit von ungefähr 120 Tagen vier Junge, die stets gleichen Geschlechts sind und auf der gleichen Entwicklungsstufe stehen. J. T. Patterson (1913) erklärt das Phänomen dieser konstanten Polyembryonie mit der Entwicklung der vier Keimanlagen aus einem einzigen befruchteten Ei. Die Keime liegen in getrennten Amnien, die in frühen Entwicklungsstadien noch nicht untereinander und mit ihrem Chorion verwachsen sind. Jedem Embryo ist eine Plazenta discoidea zugeordnet. Vier solcher bilden gemeinsam eine Placenta annularis composita. Der Allantoissack obliteriert frühzeitig (H. H. Newman und J. T. Patterson 1910).

* Unter der Leitung von Prof. Dr. H. Bautzmann.

B. Material und Methoden

Für die Untersuchungen am Amnion von *Dasypus novemcinctus* stand ein eröffneter Uterus mit zwei Embryonen von etwa 15 mm Scheitel-Steißlänge in völlig intaktem Amnion zur Verfügung Das Material wurde von der Biological Supply Company in Dallas, Texas bezogen. Es war dort zunächst in Bouinscher Lösung und dann endgültig leider in denaturiertem Alkohol fixiert worden. Die Embryonen befanden sich in einem Entwicklungsstadium, in dem die Amnien weder untereinander noch breitflächig mit ihrem Chorion verwachsen waren. Dieser Umstand war besonders günstig, weil so fast sämtliche Untersuchungen am Häutchenpräparat vorgenommen werden konnten. Zur Untersuchung des Epithels wurden unter dem Binokular einige reine Epithelhäutchen von ihrer bindegewebigen Unterlage abgezogen und isoliert betrachtet. Diese Häutchenstudien wurden durch Beobachtungen an Querschnitten ergänzt. Die Häutchen wurden frei schwimmend in Molybdänhämatoxylin nach H. Held, Eisenhämatoxylin nach M. Heidenhain, Thiazinrot-Pikrinsäure nach M. Heidenhain, Eisenalizarinlack nach K. Okajima, Kresylechtviolett „Bayer"/Leverkusen, Brillantkresylblau und Methylenblau gefärbt. Die Färbungen wurden nach Romeis (1948) durchgeführt. Versilberungen nach Bielschowsky gelangen erst dann, wenn das Objekt vorher in 5% Formol überführt worden war. Sämtliche Präparate wurden in Karion (E. Merck/Darmstadt) eingeschlossen. Die Aufnahmen wurden mit dem Zeiß Photomikroskop mit Planachromaten auf Adox KB 14 Film aufgenommen.

C. Beobachtungen

Das Amnionepithel

Das Amnionepithel von *Dasypus novemcinctus* ist ein einschichtiges Plattenepithel (Abb. 1) mit regelmäßigen, vorwiegend fünfseitigen polygonalen Zellen, die mit geraden Rändern, im allgemeinen ohne lichtmikroskopisch sichtbare Verzahnungen, aneinandergrenzen (Abb. 2). Die Zellen sind sehr flach. Dies trifft für alle Gebiete des Amnions zu. Regionale Unterschiede bezüglich der Höhe der Zellen, wie sie G. Petry (1956, S. 232) beschreibt, die aber von H. Bautzmann (1957, S. 595) als Schrumpfungsartefakte gedeutet wurden, sind in diesem frühen Stadium hier nicht vorhanden und auch nicht zu erwarten, weil das untersuchte Material in einem Stadium fixiert worden ist, in welchem das Amnion noch nicht mit einer Plazentafläche verwachsen ist. Eine Gliederung in plazentares, paraplazentares und freies Amnion ist also noch nicht möglich. Auf diese Gliederung aber bezieht sich Petry.

Der Epithelbelag ist lückenlos. Die Zellen müssen sehr fest untereinander verankert sein, da es grobmechanisch gelang, koherente Epithelhäutchen von ihrer bindegewebigen Unterlage abzuziehen.

Das Cytoplasma der nicht in Teilung befindlichen Zellen färbt sich überall *gleichmäßig* feinschollig an. Dies ist bemerkenswert, weil in anderen Amnien die Epithelzellen sich oft außerordentlich different gefärbt haben (H. Bautzmann und G. Simon-Kutscher 1959, S. 162). Das Cytoplasma ist in unterschiedlichem Maße vakuolisiert. Neben Zellen, die keine oder nur wenige kleine Vakuolen enthalten, gibt es solche, deren Cytoplasma von Vakuolen unterschiedlicher Größe geradezu wabig durchsetzt ist. In Kernnähe konfluieren die Vakuolen häufig. Sie bilden dort stellenweise perinukleäre helle Zonen (Abb. 3). Die Kernoberfläche wird in diesen Fällen nur durch schmale Cytoplasmasträhnen erreicht. Der Inhalt der Vakuolen ließ sich mit keinem unserer Farbstoffe anfärben; sie mögen Fruchtwasser enthalten. Fruchtwasservakuolen haben sich bisher nie recht anfärben lassen. Die Epithelzellen scheinen sich in verschiedenen Phasen der Sekretion oder auch der Resorption zu befinden.

Dabei fällt auf, daß die Durchsetzung des Cytoplasmas mit „Fruchtwassertröpfchen" nie zu seiner vollständigen Verdrängung oder gar zum Untergang der Zelle führt. Anscheinend gibt die Zelle Fruchtwasser ab, ohne dadurch selbst

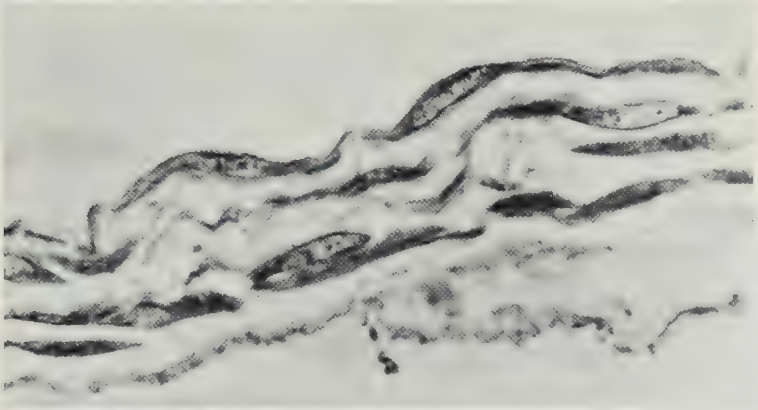


Abb. 1. Amnion von *Dasypus*, Querschnitt. Man erkennt Epithel, Bindegewebe und ein gallertiges adventitielles Gewebe am Ort des späteren Stratum intermedium. Brillantkresylblau, Phasenkontrast. Ölimmersion (Vergr. etwa 800mal), Blaugrünfilter

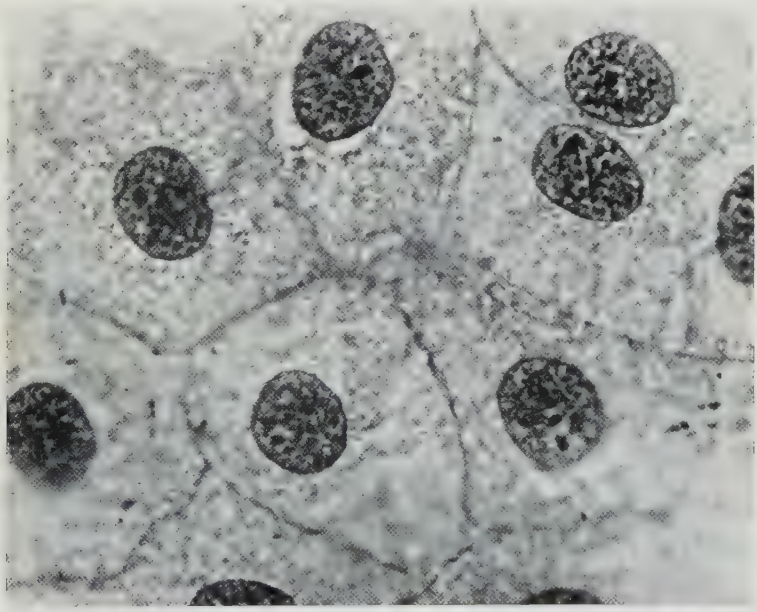


Abb. 2. Amnion von *Dasypus*, künstlich abgezogenes reines Epithelhäutchen. Färbung mit Molybdänhämatoxylin nach Held, Phasenkontrast (Vergr. etwa 800mal), Blaugrünfilter

eine dauernde Veränderung zu erfahren. Die von H. Bautzmann und Ch. Hertenstein (1957, S. 602) im menschlichen Amnion beschriebenen sog. „Kolossalzellen", wie sie bei einer vollständigen Vakuolisierung von Epithelzellen entstehen, wurden bei *Dasypus* nicht gefunden. Vermutlich spielen diese bei der Fruchtwassersekretion nur eine indirekte sekundäre Rolle, etwa für die Sekretion von Schleimstoffen ins Fruchtwasser.

Im Cytoplasma treten keine besonderen Einschlüsse auf. Man sieht lichtmikroskopisch keine cytoplasmatische „Randausstattung", z. B. Bürstensäume oder Zotten.

Die Epithelzellen haben stets nur *einen* Kern. *Mehr*kernige Zellplatten, wie sie H. Bautzmann 1953 für das Amnion des Hühnchens und 1957 (S. 593) für das des Menschen beschrieb, sind jedenfalls im untersuchten Stadium von *Dasypus* nicht vorhanden. H. Bautzmann (1955) hat freilich auf die Möglichkeit hingewiesen, daß es sich hierbei gelegentlich auch um Artefakte handeln könne. Allerdings gibt es jene mehrkernigen Platten durchaus. Die Kerne der Amnionzellen von *Dasypus* sind annähernd gleich große, fast runde oder ovale flache Scheiben mit einem feinen Chromatingerüst und zwei bis drei deutlichen Nukleolen; sie halten etwa die Mitte der Zellen ein. Kerneinschlüsse oder Kernvakuolen wurden nicht beobachtet. Die glatte Kernmembran zeigt weder größere Einbuchtungen noch Kernabschnürungen, die etwa auf eine Kernsekretion hindeuten könnten.

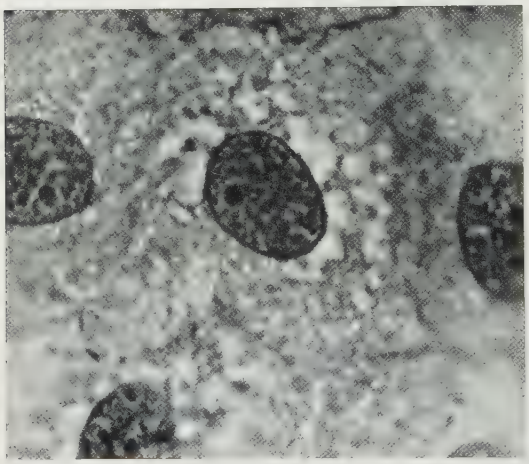


Abb. 3. Amnion von *Dasypus*, Häutchenpräparat. Epithelzelle mit weitgehend vakuolisiertem Cytoplasma. Die größeren Vakuolen konfluieren in Kernnähe. Färbung mit Molybdänhämatoxylin nach Held, Phasenkontrast, Ölimmersion (800mal)

Das *Flächenwachstum* des Amnionepithels geschieht in dem vorliegenden Stadium noch ausschließlich auf dem Wege der mitotischen Zellteilung. Auf 100 Epithelzellen kommt durchschnittlich eine Mitose. Dabei sind alle Phasen gleichzeitig da: A-Synchronie der mitotischen Teilungen. Die sich teilenden Zellen sind regelmäßig verteilt; es gibt keine Teilungsnester, die Zuwachszentren darstellen könnten. Die Flächenzunahme scheint überall gleichmäßig zu sein. Das Cytoplasma färbt sich intensiver und homogener an als das der umgebenden Zellen. Die Kernteilungsfigur ist von einem helleren flüssigeren Cytoplasmahof umgeben, der „Spielraum" für die chromosomalen Bewegungen gewähren mag. Auffallend ist das klare Heraustreten von „Interzellularbrücken" bei fast allen mitotischen Zellen (Abb. 4a und b). Es ist möglich, daß bei dem Bestreben der Zelle, eine verhältnismäßig kleine Oberfläche unter leichter Verdickung anzunehmen, die Verbindung mit den Nachbarzellen gelockert und die Interzellularbrücken verlängert werden. Dabei werden die interzellulären Spalträume weiter und lichtmikroskopisch sichtbar. An einigen Stellen wurden gelegentlich auch bei nicht in Teilung befindlichen Zellen ausnahmsweise ähnliche Bilder gesehen (Abb. 5). Interzellularbrücken zwischen Amnionepithelzellen fanden schon H. Bautzmann und Ch. Hertenstein (1957, S. 596, Abb. 3a und b) am menschlichen Neugeborenenamnion.

Das Amnionbindegewebe

Bei der Besprechung der bindegewebigen Strukturen des Amnions sei gleich gesagt, daß sich *keine Muskulatur* darin fand. Das gleiche Ergebnis zeigten auch

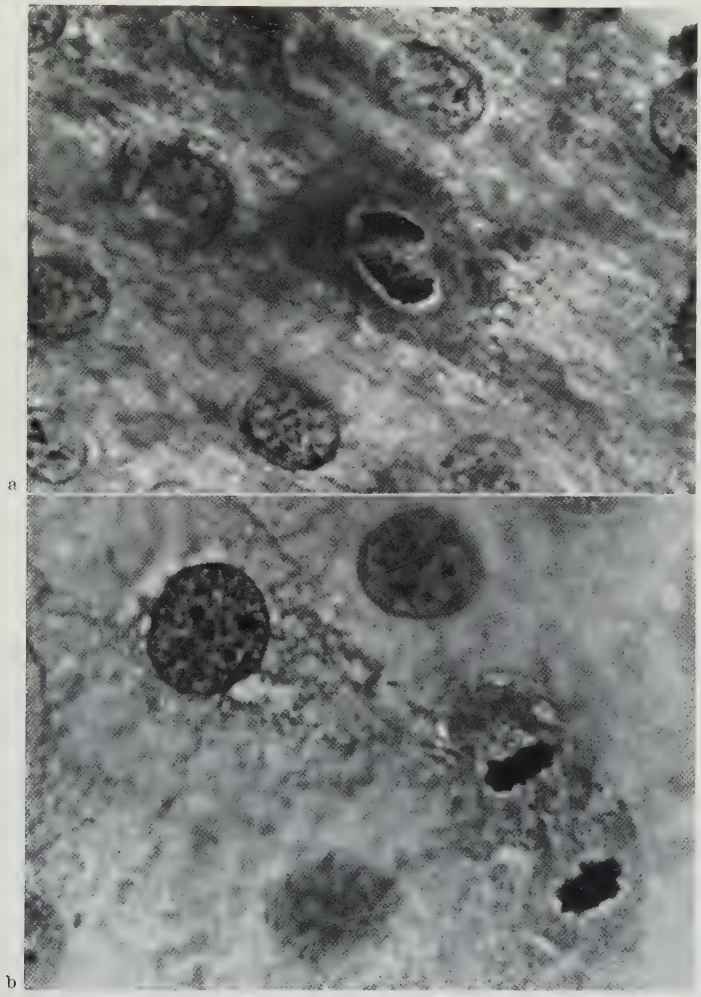


Abb. 4. a Amnion von *Dasypus*, Häutchenpräparat. Aufsicht auf einen Dyaster. Cytoplasma dunkel, die Kernteilungsfigur von einem hellen Hof umgeben. Am ganzen rechten Zellrand Interzellularbrücken. Färbung mit Kresylechtviolett, Phasenkontrast Ölimmersion (800mal), Grünfilter. b Amnion von *Dasypus*, Häutchenpräparat, Telophase einer Epithelmitose. Färbung mit Molybdänhämatoxylin nach Held, Phasenkontrast Ölimmersion (800mal)

die Untersuchungen von H. Bautzmann und Ch. Hertenstein (1957, S. 691 bis 699) am Amnion einiger primitiver Säuger. Die Amnionmuskulatur und demzufolge auch die „Amnionmotorik" müssen schon vor der Entwicklung aller dieser untersuchten archaischen Formen verlorengegangen sein. Es ist leider nicht festzustellen, ob das Schwinden der Amnionmuskulatur entwicklungsgeschichtlich genau mit dem Auftreten der ersten Säuger zusammenfällt.

Das Bindegewebe besteht beim Gürteltieramnion aus einem Netzwerk von *Fibrozyten*, das von einem Netz kollagener Fasern durchzogen wird. Die Fibro-

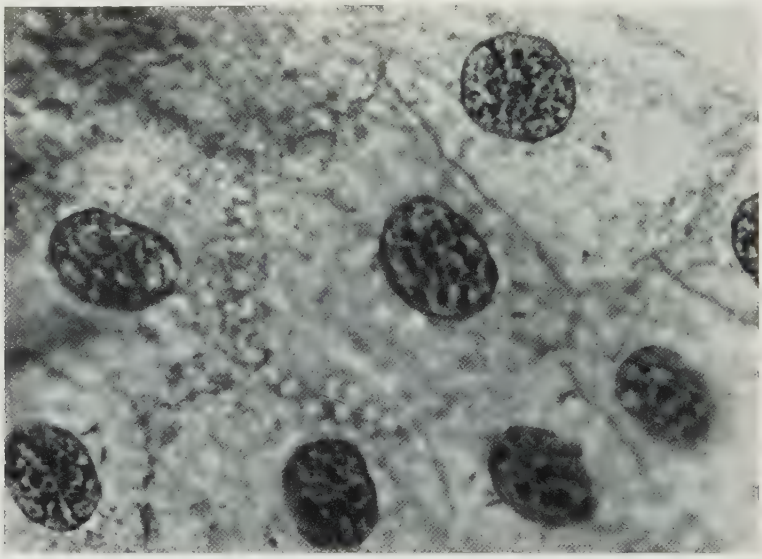


Abb. 5. Amnion von *Dasypus*, Häutchenpräparat, Interzellularbrücken am linken Rand der mittleren Epithelzelle. Färbung mit Molybdänhämatoxylin nach HELD, Phasenkontrast Ölimmersion (800mal), Blaugrünfilter

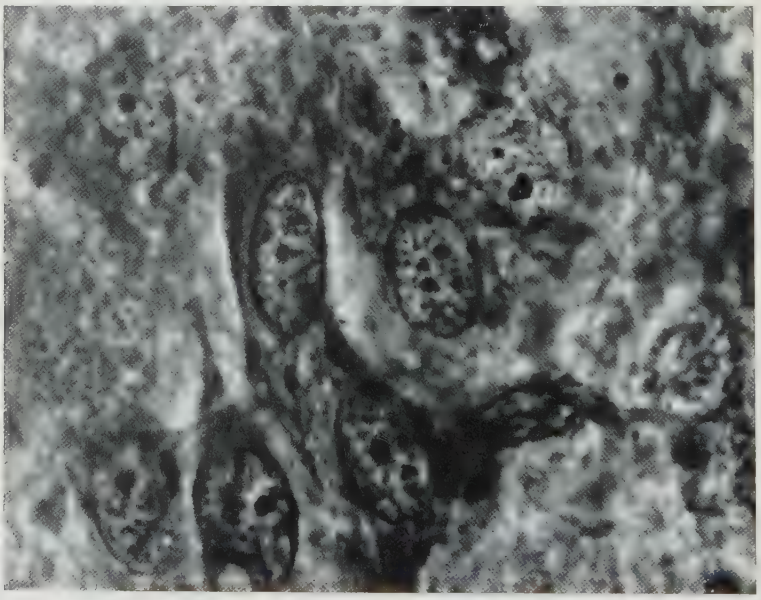


Abb. 6. Amnion von *Dasypus*, Häutchenpräparat, Fibrozytennetz der epithelfernen Schicht. Färbung mit Brillantkresylblau, Phasenkontrast Ölimmersion (800mal), Gelbfilter

zyten lagern sich vorwiegend in zwei Ebenen parallel zur Oberfläche des Amnions. Untereinander sind diese Systeme durch zahlreiche Cytoplasmaausläufer in

Kontakt, so daß beim Fokussieren der Eindruck eines dreidimensionalen Maschenwerkes entsteht. Dabei haben die verhältnismäßig plumpen Zellen der epithelnahen Schicht große Lücken zwischen sich. Der netzige Charakter der Gewebstextur kommt in der epithelfernen Schicht besonders deutlich zum Ausdruck.

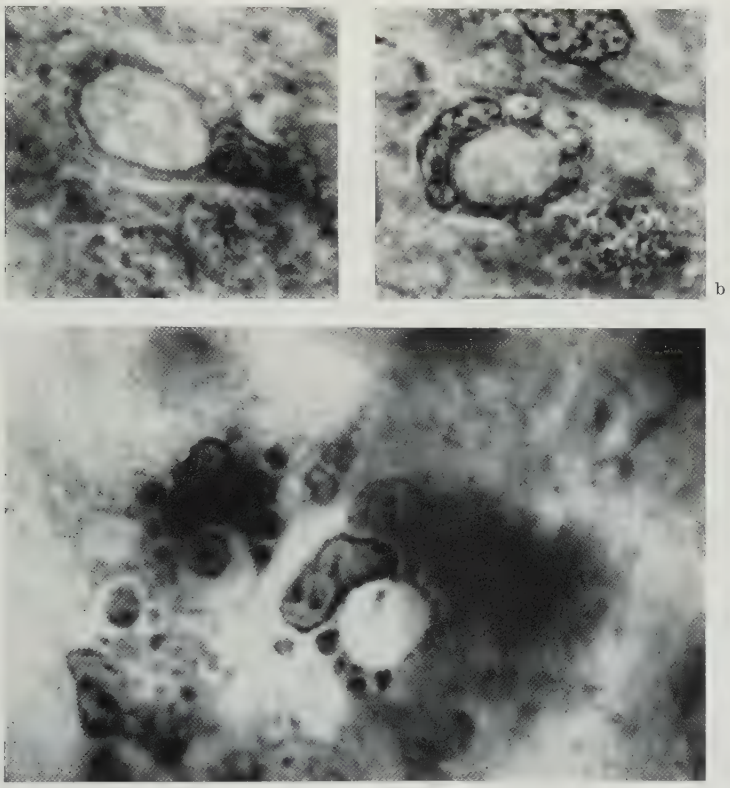
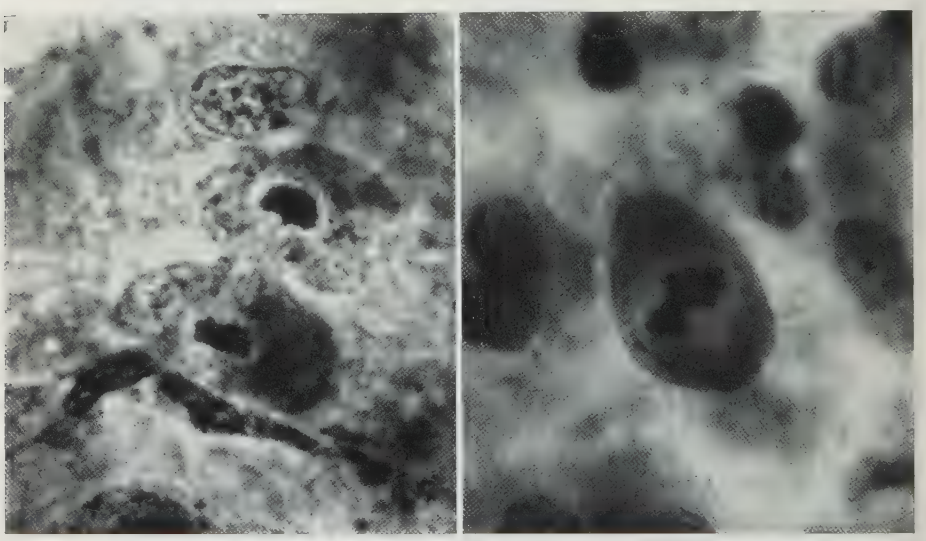


Abb. 7a—c. Amnion von *Dasypus*, Häutchenpräparat. Vakuolenzellen im Bindegewebe. a Das Cytoplasma ist durch eine große Vakuole an den Rand gedrückt, der Kern liegt rechts in einem seitlichen Cytoplasmazipfel. Färbung mit Eisenhämatoxylin nach M. HEIDENHAIN, Phasenkontrast Öl (800mal). b Neben einer großen, mehrere kleine Vakuolen, der Kern liegt sichelförmig am Rande. Färbung mit Carminessigsäure, Phasenkontrast Öl (800mal), Grünfilter. c Zwei Vakuolenkomplexe nebeneinander. Die Kerne in Fragmente zerfallen. Im Zentrum der linken und mittleren Vakuole pyknotische Kernreste. Schräg rechts oberhalb des dunklen gelappten Kerns der mittleren Vakuolenzelle scheinen Kern„trümmer" ins Bindegewebe abgestoßen zu sein. Färbung mit Molybdänhämatoxylin nach HELD, Ölimmersion (800mal), helles Blaufilter

In Abb. 6 ist keine klare Trennung der Zellen mehr möglich. Die Zellen dieser Schicht sind langgestreckt und bilden ein Gefüge, das nach allen Seiten gleichmäßig ausgerichtet ist, wohl entsprechend der gleichmäßigen Beanspruchung, der das Amnion durch den Druck des Fruchtwassers ausgesetzt ist.

Das feingranulierte Cytoplasma der Fibrozyten enthält häufig *Vakuolen* unterschiedlicher Größe. Das Maß der Vakuolisierung schwankt von einer kleintropfigen Aufhellung des Cytoplasmas bis zu dessen Verdrängung auf einen schmalen Randsaum durch eine Riesenvakuole. Diese scheint durch Verschmelzung mehrerer kleinerer zu entstehen. Der Vakuoleninhalt ließ sich, wie der der Epithelvakuolen, nicht anfärben. Es handelt sich vermutlich auch hier um

Fruchtwasser (Abb. 7a—c). Dem Wachstum der Vakuolen geht eine Veränderung des Kerns parallel. Er wird zunächst an einen Rand der Zelle gedrängt. Durch den wachsenden Druck der Vakuole wird er sichelförmig. In späteren Stadien werden Segmente abgeschnürt, die auf die gesamte Peripherie der Vakuole verteilt werden. Dabei scheinen häufig einzelne Fragmente in das Innere der Vakuole aufgenommen zu werden, wo sie möglicherweise aufgelöst werden. Die Kern-„trümmer" bleiben nicht nur in unmittelbarer Nähe der Vakuolen, sie treten auch in geringer Entfernung von der vakuolisierten Zelle im Bindegewebe auf



a b

Abb. 8 a u. b. Amnion von *Dasypus*, Häutchenpräparat. a Telophase einer Bindegewebsmitose. Beachte die „Fäden" zwischen den Tochtersternen. Färbung mit Molybdänhämatoxylin nach HELD, Phasenkontrast Öl (800mal), Blaufilter. b Monaster einer Bindegewebsmitose. Dünne Cytoplasmafäden schieben sich auf die benachbarten Zellen zu. Am linken Rand eine breite cytoplasmatische Anlehnung an einen benachbarten Fibrozyten. Färbung mit Molybdänhämatoxylin nach HELD, Phasenkontrast Öl (800mal), Blaugrünfilter

(Abb. 7c). Vielleicht ist es von Bedeutung, daß der Kern der Vakuolenzellen stets seitlich neben der Vakuole liegt und nie zwischen Vakuole und Epithel. Zwischen Vakuole und Epithel könnte ein Stoffaustausch vor sich gehen, der so nicht durch den Kern behindert wäre. Mehrkernige Zellzysten, die durch Verschmelzung zweier oder mehrerer Zellen entstehen (G. PETRY 1956), wurden trotz der großen Zahl von wie oben beschriebenen Gebilden nicht beobachtet. Es ist zu erwägen, daß auch diesen Vakuolenzellen eine Bedeutung für die Produktion des Fruchtwassers und dessen anschließende Durchschleusung durch das Epithel in die Amnionhöhle zukommen könnte. Daß es sich um rein degenerative Prozesse in diesen Zellaggregaten handelt, die so zum Ausdruck kämen, ist in Anbetracht des jugendlichen Stadiums des vorliegenden Materials nicht ohne weiteres anzunehmen.

Die zahlreichen Mitosen und die auch quantitativ schwieriger zu beurteilenden „Amitosen", die im Bindegewebe gesehen wurden, lassen eher auf einen besonders lebhaften Stoffwechsel und ein intensives Vermehrungswachstum

schließen. Auf etwa 50 Fibrozyten kommt eine Mitose. Wie schon im Epithel, so liegen auch im Bindegewebe alle Mitosestadien gleichzeitig vor: A-Synchronie der Kernteilungen. Bei der Beurteilung der Mitosen fiel noch zweierlei auf.

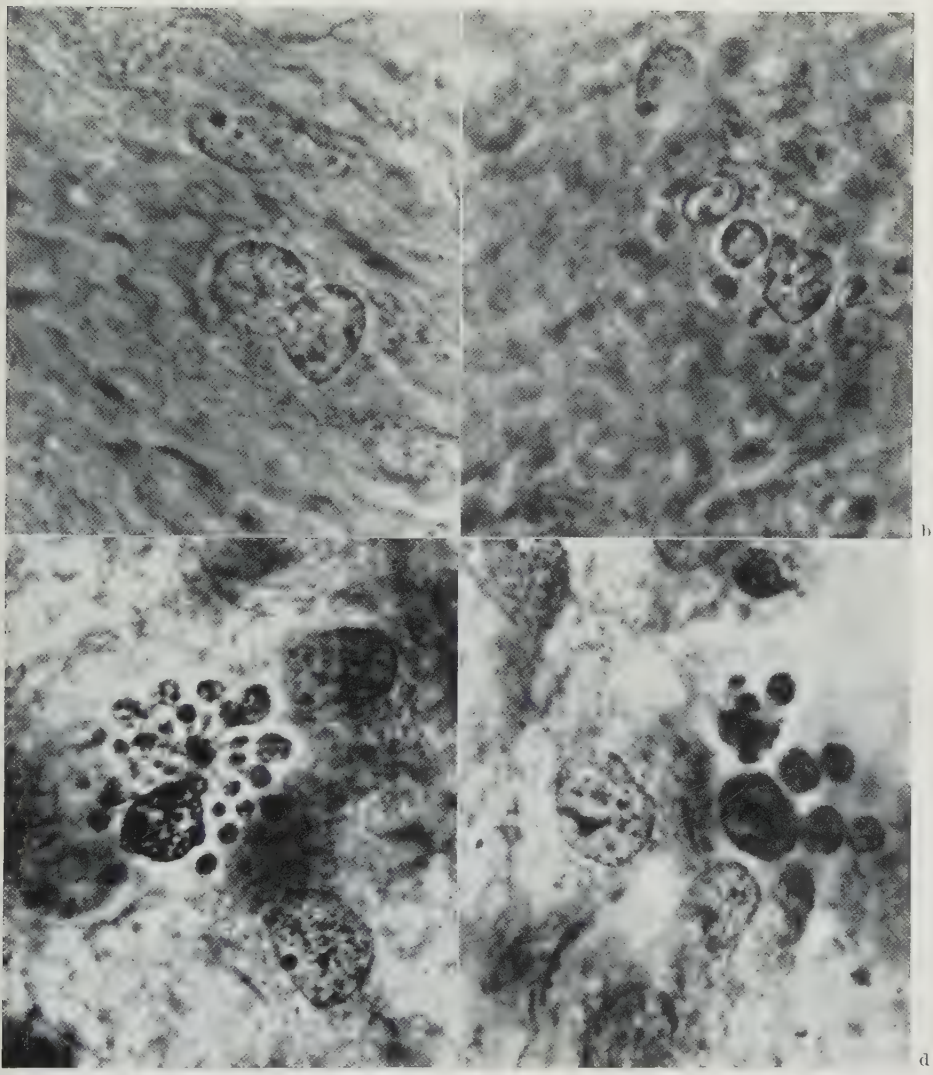


Abb. 9a—d. Amnion von *Dasypus*, Häutchenpräparate. „Amitosen" im Bindegewebe. a Kern scheinbar kurz vor der Durchschnürung, Versilberung, Phasenkontrast Öl (800mal), helles Blaufilter. b Drei kleine Kerne in einer Zelle. Versilberung, Phasenkontrast Öl (800mal), helles Blaufilter. c u. d. Kernfragmentationen (vgl. Text). Färbung mit Molybdänhämatoxylin nach Held, Phasenkontrast Öl (800mal), helles Grünfilter

Abb. 8a zeigt die Telophase einer Fibrozytenmitose. Deutlich sind die beiden Tochtersterne zu erkennen, zwischen denen das Cytoplasma feine „Fäden" zu bilden scheint. Es könnten dies die von F. Wassermann (1929, Bd. 2, S. 131, Abb. 126) beschriebenen cytoplasmatischen „Commissurfasern" sein, die eine „achromatische Brücke" zwischen den Chromosomen der Tochtersterne

darstellen. Die dunkleren Anteile dieser Bänder könnten Mitochondrien sein, die sich während der Anaphase manschettenartig um die achromatische Brücke

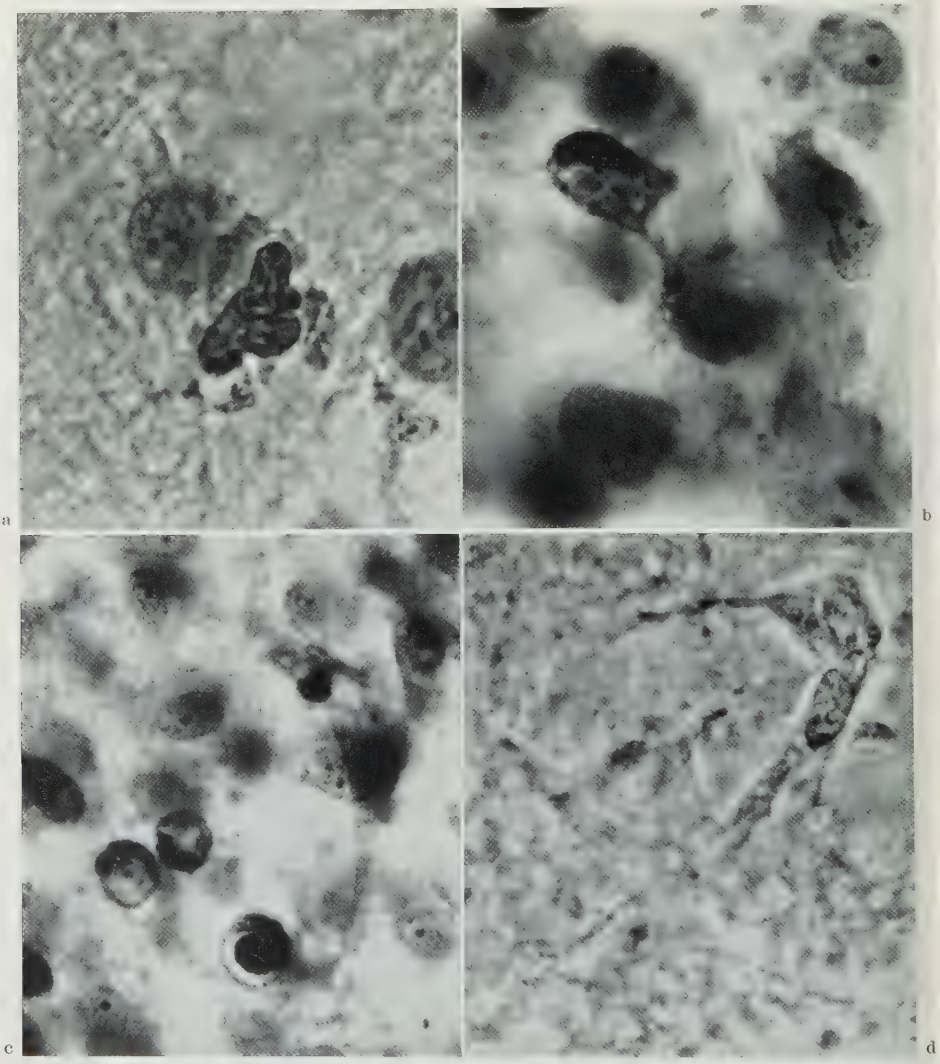


Abb. 10a—d. Amnion von *Dasypus*, Häutchenpräparate. a Subepithelialer Histiozyt mit gelapptem Kern und einer größeren Vakuole. Die Fasern der Basalmembran haben sich andeutungsweise mit angefärbt. Färbung mit Molybdänhämatoxylin nach HELD, Phasenkontrast Öl (800mal), helles Grünfilter. b Histiozyt mit schaumig vakuolisiertem Cytoplasma. Lobopodien, die sich zu Filipodien aufsplittern, umgreifen eine Nachbarzelle. Färbung mit Molybdänhämatoxylin nach HELD, Phasenkontrast Öl (800mal), Blaugrünfilter. c Runde Ruheform der Histiozyten mit exzentrischem Kern und vakuolisiertem Cytoplasma. Färbung mit Molybdänhämatoxylin nach HELD, Phasenkontrast (400mal), Blaugrünfilter. d Weit verzweigter Histiozyt, Wanderform. Im Cytoplasma feine Vakuolen und Granula. Links unten an einem dünnen Cytoplasmafaden eine Anschwellung: Klasmazytose. Osmiert, Phasenkontrast Öl (800mal), helles Blaufilter

lagern (F. WASSERMANN 1929, Bd. 2, S. 132, Abb. 132). Dasselbe ist wundervoll in dem Phasenkontrast-Film über die Meiosen im Stabheuschreckenhoden zu beobachten, den Dr. MICHEL (Firma Zeiß) gedreht hat. An die linke Tochterzelle

legt sich unmittelbar ein länglicher Histiozyt an. (Da sich die mitotische Zelle im allgemeinen weitgehend aus der Verbindung mit den „ruhenden" Zellen löst, war es auffallend, daß in diesem Falle an der Kontaktfläche zwischen beiden Zellen auch bei sorgfältigstem Fokussieren die Zellgrenzen nicht sicher zu erkennen waren. Es könnte sein, daß hier eine noch unbekannte Beziehung zwischen dem Histiozyten und der mitotischen Zelle besteht. Es handelt sich hier allerdings um eine Einzelbeobachtung.) Abb. 8b zeigt die Aufsicht auf den Rand eines Monasters einer Fibrozytenmitose. Der Zelleib ist abgerundet, das Cytoplasma intensiv homogen angefärbt. Auffallend sind die cytoplasmatischen Fortsätze, die zentrifugal vom Rande der Zelle auf die umgebenden Fibrozyten zuzukriechen scheinen. Am oberen Rande ist eine breitere Cytoplasmabrücke mit einer Nachbarzelle hergestellt. Entsprechend der Ausbreitung des Fibrozytennetzes parallel zur Oberfläche des Häutchens sind die Achsen der Teilungsfiguren dieser Ebene etwa angepaßt.

Neben den zahlreichen Mitosen wurden auch *Kernfragmentationen* beobachtet, von denen man nicht weiß, ob man sie zu Amitosen rechnen soll. Abb. 9a dürfte vielleicht einen eingeschnürten Fibrozytenkern kurz vor der vollständigen Durchschnürung wiedergeben, Abb. 9b drei kleinere verschieden große Kerne, die zu einer Zelle gehören und vermutlich aus einem Kern entstanden sind. Mehrfach wurde eine seltsame Form von „Amitose" beobachtet, eine hochgradige Kernfragmentation, die an ein berstendes Schrapnellgeschoß erinnert (Abb. 9c, d). G. Petry (1961) fand ein ähnliches Bild im Epithel eines Katzenamnions als Einzelbeobachtung. Beim Gürteltieramnion wurden derartige Kernbilder ausnahmslos im Bindegewebe gesehen. Abb. 9c einer ebensolchen „explosionsartig" anmutenden Kernzertrümmerung zeigt neben einem größeren Kern mit gut erhaltenen Konturen ungefähr 26 Fragmente, die konzentrisch um einen „Teilungs"mittelpunkt gelagert sind. Während die mittelpunktsnahen Tochterkerne noch durch einen Cytoplasma„strahl" mit dem Zentrum verbunden sind, haben sich die entfernteren vollständig aus dem ursprünglichen Kernverband gelöst. Da sich bei einigen peripheren Fragmenten die Kernsubstanz sehr aufgelockert und wenig scharf begrenzt zeigt, muß man sich allerdings fragen, ob es sich wirklich um im herkömmlichen Sinne „echte" amitotische Vorgänge handelt, oder ob diese Kernfragmente aufgelöst werden.

Neben den Fibrozyten treten in allen Schichten des Bindegewebes zahlreiche *Histiozyten* (Hofbauer-Zellen) auf. Neben den Ruheformen mit stark aufgelockertem Cytoplasma (Abb. 10c), finden sich verzweigte histiozytäre Wanderformen. Ihre Kerne sind gewöhnlich dunkler als die der Fibrozyten, häufig etwas gelappt und meistens dem Zelleib entsprechend länglich geformt. Das Cytoplasma ist schaumig vakuolisiert und gleichzeitig granuliert. An den feinen Ausläufern treten häufig Anschwellungen auf, die oft nur durch äußerst dünne Fäden mit dem Histiozytenzentrum verbunden sind (Abb. 10d), ehe sie abgestoßen werden. Ranvier (1890, 1900) meinte, diese Abschnürung und anschließende Auflösung der Plasmakölbchen (Klasmacytose) habe eine Bedeutung für die Ernährung benachbarter Fibrozyten. Andere Histiozyten strecken lange Lobopodien aus, die sich zu Filipodien aufsplittern und wie mit feinsten „Fangarmen" Nachbarzellen umgreifen (Abb. 10b). Schließlich sind noch die subepithelialen „Schleusenzellen" zu nennen, die H. Bautzmann mit R. Schröder (1955) schon am Amnion

der Kreuzotter darstellte (dortige Abb. 4, S. 352). Abb. 10a zeigt einen Histiozyten mit grobgelapptem Kern und vakuolisiertem Cytoplasma. Die Epithelzellkerne, die in einer anderen Ebene liegen, kommen bei dieser optischen Einstellung nur unscharf zur Darstellung. Andeutungsweise hat sich in dem Präparat die Basalmembran gitterartig mit angefärbt (s. den Bildgrund der Abb. 10a, besonders links).

Die *faserigen* Strukturen des Bindegewebes gliedern sich in drei Systeme. Unmittelbar unter dem Epithel liegt eine dünne Basalmembran, in der die Ver-

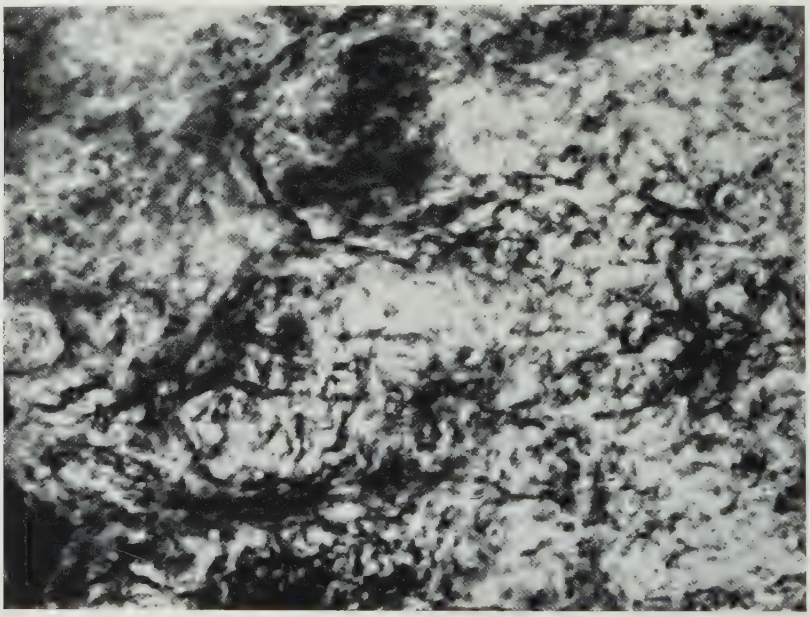


Abb. 11. Amnion von *Dasypus*, Häutchenpräparat. Subepitheliale Basalmembran. Bielschowsky, Phasenkontrast Öl (800mal), helles Grünfilter

ankerung des Epithels erfolgt. Ihre feinen Gitterfasern überschneiden sich in mehreren Richtungen (Abb. 10a, 11). Leider ließen sich diese Fasern mit Silber nur unvollständig imprägnieren. Den Hauptanteil an Fasern bildet ein grobmaschiges Netz, das das gesamte Bindegewebe durchzieht. Breite Bündel kollagener Fasern umziehen ovale Lücken, in die sich häufig Bindegewebszellen eingelagert finden. An den Stellen, an denen sich die Bündel verzweigen, werden sie teilweise besenreiserartig aufgesplittert. Diese einzelnen Fasern durchflechten sich und bilden engergestellte Netze. Das kollagene Maschenwerk ist flächig nach allen Seiten gleichmäßig ausgerichtet (Abb. 12).

Das dritte Faserelement ist das *Gitterfasernetz* in der adventitiellen Zone des späteren Stratum intermedium. Diese relativ gerade ausgerichteten Gitterfasern bilden Maschen unterschiedlicher Größe (Abb. 13). Das „Stratum intermedium" hat, wie gesagt, in dem beschriebenen Stadium noch keine feste Verbindung mit dem Chorion aufgenommen. Es bildet einen schleimigen Film über dem Bindegewebe des Amnions etwa von der Dicke des zellhaltigen Bindegewebes und enthält neben den beschriebenen Gitterfasern kaum Fibrozyten und nur einige Histio-

Abb. 12. Amnion von *Dasypus*, Häutchenpräparat. Breitbandiges, kollagenes Fasernetz mit ovalen Lücken. Teilweise besenreiserartige Aufsplitterung der Faserbündel. Bielschowsky, Ölimmersion (800mal), Blaugrünfilter

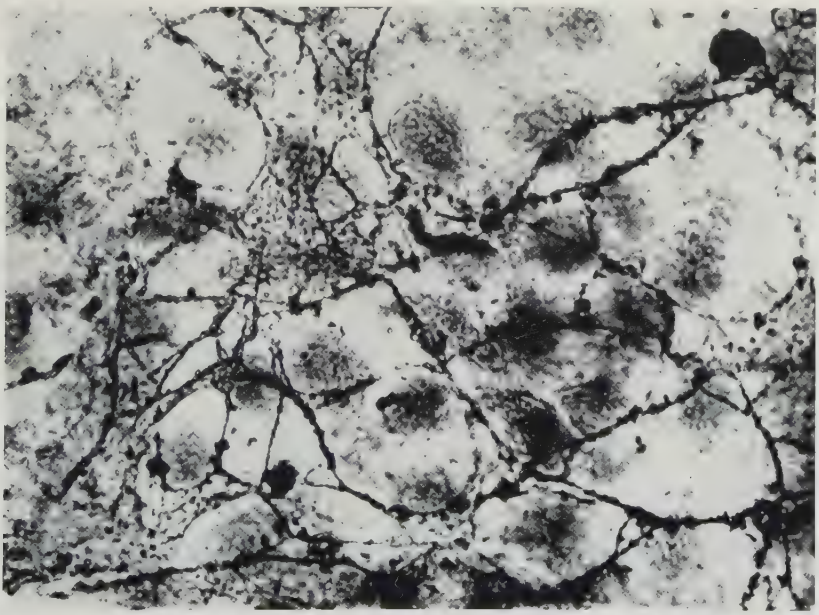


Abb. 13. Amnion von *Dasypus*, Häutchenpräparat. Gitterfasernetz der adventitiellen Außenzone des Amnionbindegewebes. Bielschowsky, (800mal), Gelbgrünfilter

zyten, die hier vorwiegend die runde Ruheform zeigen. Die drei Fasersysteme bilden zusammen ein einheitliches nach allen Richtungen gleichmäßig dehnbares Gefüge. *Elastische* Fasern konnten *nicht* nachgewiesen werden.

D. Diskussion

Während der Feinbau des Amnions sowohl verschiedener Tierformen als auch der einzelnen Entwicklungsstadien weitgehend bekannt ist, besteht noch keine volle Klarheit in den Fragen, die den Mechanismus der Fruchtwasserbildung und speziell die Rolle betreffen, die das Amnion dabei spielt.

G. J. Vossberg u. Mitarb. (zit. nach H. Martius 1959, S. 57) fanden, daß beim menschlichen Foeten vom 6. Monat an das gesamte Fruchtwasser in etwa 3—4 Std ausgetauscht wird. In dieser Zeit muß also die Menge von 500—600 ml (!) Fruchtwasser in die Amnionhöhle sezerniert und die entsprechende Menge resorbiert werden. Ein Teil der Flüssigkeit wird von der foetalen Oberfläche und dem Verdauungs- und Respirationstrakt aufgenommen (H. Bautzmann u. P. Lemburg 1960). Sind die letzten beiden Systeme durch Mißbildungen verlegt, so tritt Polyhydramnie auf (H. Bautzmann u. G. Simon-Kutscher 1959; Lit.).

Das Amnion selbst aber scheint ebenfalls an der Resorption des Amnionwassers beteiligt zu sein. G. Bourne (1958) berichtet, daß er in die Amnionhöhle injizierte Farbstoffe 3 Std später in Hofbauer-Zellen des Amnionbindegewebes nachweisen konnte. Dasselbe fanden auch H. Bautzmann mit W. Schmidt und P. Lemburg (1960), als sie Myofer (Eisen III-Dextrankomplex, Höchst) oder Tuschesuspensionen in den Amnionraum brachten. In einigen Fällen hat G. Bourne die Vakuolen der Histiozyten mit einem grünlichen Inhalt beladen gefunden, den er für Meconium hält. Hierbei besteht also offensichtlich eine Weitergabe, wahrscheinlich von Zelle zu Zelle von der Amnionhöhle ausgehend durch das Epithel in das Bindegewebe, wobei u. a. die Hofbauer-Zellen die im Fruchtwasser gelösten Stoffe teilweise speichern und konzentrieren.

Der Stoffaustausch zwischen Amniongewebe und Amnionhöhle könnte an bestimmten Stellen des Epithels gesteuert werden. H. Bautzmann und R. Schröder (1955, S. 351) fanden an den „Treffpunkten" mehrerer Epithelzellen „Lücken", denen jedesmal eine stark vakuolisierte „Schleusenzelle" zugeordnet war. Es wäre denkbar, daß diese Zellen eine partielle Kontrolle auf den Stoffaustausch ausüben könnten. Ähnliche epitheliale Poren erwähnt G. Bourne (1958). Er fand außerdem häufig dunklere Streifen im Epithel und vermutet, daß es sich hier um Meconium handele, das aus der Amnionhöhle durch das Epithel in das Bindegewebe wandere. Bei der Betrachtung der Abb. 90 von Bourne fällt jedoch die große Ähnlichkeit dieser „Meconiumstreifen" mit Faltenbildungen in histologischen Schnittpräparaten auf. Bei *Dasypus* wurden im Epithel keine derartigen Streifen oder Lücken, wohl aber mehrfach „Schleusenzellen" unter den Treffpunkten der Epithelzellen gefunden.

Neben diesen kleinen Epithel„poren" fallen bei anderen Objekten in Schnittpräparaten häufig die von H. Bautzmann und Ch. Hertenstein (1957, Abb. 10) beschriebenen Kolossalzellen auf. Sie wurden auch von G. Bourne gesehen (1958). Diese Zellen, die aus Epithelzellen entstehen, sind prall elastisch mit einem Stoff gefüllt, den H. Bautzmann (1957) nicht für Fruchtwasser, sondern für ein schleimiges Produkt hält. Sie werden wahrscheinlich in toto in die Amnionhöhle abgestoßen, wo ihre Zellwand aufgelöst und ihr Inhalt mit dem Amnionwasser vermischt werden könnte.

Das Amnion ist außer bei Huftieren und Walen völlig gefäßlos, ebenso das gallertige Stratum intermedium. Das Fruchtwasser könnte durch Diffusion über das Stratum intermedium durch das Amnionbindegewebe und das Amnion-

epithel in die Amnionhöhle wandern. Wieweit Diffusion — auch in gegensätzlicher Richtung — tatsächlich im Spiele ist, läßt sich ohne geeignete Experimente nicht entscheiden.

Ein anderer Prozeß der doppelt gerichteten Passage durch die Amnionzellen, der sein Analogon in Untersuchungen J. Staubesands (1961) für andere Epitheltapeten von Höhlen- und Rohrsystemen hat, ist experimentell greifbar. J. Staubesand hat neuestens die sehr schnelle Passage von korpuskulären Stoffen durch die Epithelien der Herzbeutelhöhle und der Peritonealhöhle sowie des Gefäßwandendothels aufgezeigt. Sie geschieht mit den Mitteln der „Membranvesiculation" (Bennet); „Pinozytose" (Lewis) wurde auch von H. Bautzmann und W. Schmidt (1960, S. 307) im Myofer-Versuch am Amnionepithel gesehen. Die Ergebnisse dieser Versuche schließen die Mitbeteiligung von Diffusionsprozessen an der Fruchtwasserpassage nicht aus. Es ist aber nötig, darauf hinzuweisen, daß keines der genannten Experimente ein Zeichen dafür ergeben hat, daß elektronenmikroskopisch nachweisbare Markierungssubstanzen, gleich welcher Art, extrazellulär in Interzellularräumen vorkommen (H. Bautzmann in Versuchen mit P. Lemburg).

Der ständige Transport von frischem Fruchtwasser an alle Oberflächen der Amnionhöhle wird bei den Sauropsiden durch die rhythmischen Kontraktionen der autonomen Amnionmuskulatur gefördert (H. Bautzmann 1953, 1955, 1956, 1957). Bei den *Säugetieren*, die keine Amnionmuskulatur besitzen, geschieht die Durchmischung des Fruchtwassers wahrscheinlich ersatzweise durch die frühen Schwangerschaftskontraktionen der Uterusmuskulatur, die lange vor den Geburtswehen nachzuweisen sind.

Die Frage der unterschiedlichen Morphologie des Amnions entsprechend seiner verschiedenen topographischen Beziehungen zur Plazenta ist immer wieder diskutiert worden. G. Petry (1956, S. 232) und G. Bourne (1958) betonten, daß das Epithel über der Plazenta hochprismatisch sei, während es im freien Amnion flach werde. H. Bautzmann (1957, S. 600) zeigte an einem in toto fixierten Mäuseuterus, daß das Epithel des gesamten Amnions von flachen Zellen gebildet wird. Dasselbe beobachtete er gelegentlich einer Demonstration von in toto fixierten menschlichen Früchten bei Boyd (Cambridge). Die prismatischen Formen sind Schrumpfungsartefakte, die bei der Entnahme der Eihäute aus dem Uterus entstehen. Ein ähnliches Bild wie Abb. 7 von H. Bautzmann (1957) ohne zonale Unterschiede bot auch das Amnion von *Dasypus*. Auch in diesem allerdings frühen Stadium ergaben sich keine Anhaltspunkte für eine beginnende morphologische oder physiologische Differenzierung des Epithels in Regionen. Es spricht alles dafür, daß das Amnion in jedem Entwicklungsstadium von einem einheitlichen Epithel überzogen ist.

Wie weit sich das Epithel im Laufe der Schwangerschaft bei *Dasypus* verändert, ist an Hand des untersuchten Materials leider nicht zu sehen. Untersuchungen von H. Bautzmann und Ch. Hertenstein (1957, S. 597), H. Bautzmann und G. Simon-Kutscher (1959, S. 166), G. Petry (1956, S. 232) und G. Bourne (1958) deuten darauf hin, daß gegen Ende der Schwangerschaft eine teilweise Degeneration einsetzen könnte, wobei ganze Zellgruppen und Zellstraßen unterzugehen scheinen. Diese Zellen werden wohl abgeschuppt. Jedenfalls sind im Fruchtwasser Epidermisschuppen des Keimes nachzuweisen, unter denen Amnionzellen sein könnten.

Die histologische Struktur des Amnions des beschriebenen Stadiums von *Dasypus novemcinctus* bietet keinen eindeutigen Hinweis dafür, daß das Amnion allein die Sekretion des Fruchtwassers leistet. Es wäre zu untersuchen, ob der embryonale Organismus im Rahmen der Fruchtwasserzirkulation nur die Aufgabe der Resorption hat, oder ob auch der Foet unmittelbar Fruchtwasser abzugeben vermag.

Als Sekretionsorgan käme zunächst die embryonale Epidermis in Frage. Dabei muß diese Möglichkeit wohl im wesentlichen von vornherein auf die erste Hälfte der Keimesentwicklung beschränkt werden, da nach dieser Zeit die Verhornung der Epidermis beginnt. Etwa zum gleichen Zeitpunkt wird jedoch die fetale Niere funktionsreif; nach dem 6. Monat wurden spontane Urinentleerungen des Foeten in die Amnionhöhle nachgewiesen (V. Friedberg 1955). Für einen Zusammenhang zwischen Nierenfunktionsfähigkeit und Fruchtwasserbildung in den späteren Monaten der Embryonalentwicklung spricht außerdem die Erfahrung, daß bei Nierenmißbildungen oder beim Fehlen einer oder beider Nieren häufig Olygohydramnie beobachtet wurde (K. Benirschke 1958). Es fällt schwer, hier keinen Zusammenhang der Art zu vermuten, wie er — freilich im umgekehrten Sinne — für das gemeinsame Auftreten bestimmter fetaler Mißbildungen mit Polyhydramnie bewiesen wurde.

Es scheint sicher zu sein, daß das Amnion durch die Fruchtwassersekretion eine wichtige Bedeutung für den Stoffwechsel des Keimes hat. Es wäre jedoch denkbar, daß nach dem Abschluß der Plazentation vielleicht auch der Keim in zunehmendem Maße an der Fruchtwassersekretion beteiligt wird.

Zusammenfassung

Die Studien von H. Bautzmann und Ch. Hertenstein am Amnion primitiver Säuger wurden ergänzt durch Untersuchungen des Gürteltieramnions. Eine Amnionmuskulatur wurde auch bei diesem archaischen Säuger nicht gefunden. Wenn sie bei Säugern überhaupt vorkommt, muß sie zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Säugetierphylogenese aufgegeben worden sein.

Die einzelnen Systemanteile des Amnions werden beschrieben.

1. Das Epithel ist ein einfaches *flaches* Plattenepithel mit einkernigen polygonalen Zellen. Die Vermehrung der Epithelzellen geschieht im untersuchten Stadium noch ausschließlich durch Mitose.

2. Das Bindegewebe besteht aus einem zweischichtigen Fibrozytenverband. Im Bindegewebe liegen Zellen mit Riesenvakuolen, deren mögliche Bedeutung für die Fruchtwassersekretion diskutiert wird. Die Vermehrung der Fibrozyten erfolgt im ganzen mitotisch. „Amitose"-Bilder betrafen meist den Kern allein. Wiederholt gefundene eigentümliche Kernfragmentationen in zahlreiche Kernteile werden an einem Beispiel beschrieben.

3. Histiozyten (Hofbauer-Zellen) kommen in der Ruheform und als Wanderzellen vor. Stadien der Klasmazytose sind häufig zu finden.

4. Die faserigen Elemente gliedern sich in eine feinmaschige subepitheliale Basalmembran, ein grobmaschiges Netz aus kollagenen Faserbündeln und das Gitterfasernetz der Oberflächenzone, an deren Stelle sich in späteren Stadien das Stratum intermedium befindet.

5. Fruchtwasserbildung und -resorption werden an Hand des Dasypusmaterials kurz diskutiert. Dabei wird auf die Beteiligung der Bindegewebsschicht

an diesen Phänomenen hingewiesen. Die Fragen nach der Rolle von Diffusion und Pinozytose werden erörtert.

Literatur

Bautzmann, H.: Fruchthüllenmotorik und Embryokinese. Ihre Natur und Bedeutung für eine physiologische Embryonalentwicklung bei Tier und Mensch. Arch. Gynäk. **187**, 519—545 (1956).

—, u. Ch. Hertenstein: Vergleichende Studien über Bau und Funktion des Amnions. Neuere Befunde bei Vögeln und Säugern. Z. Zellforsch. **45**, 676—701 (1957).

— — Zur Histogenese und Histologie des menschlichen fetalen und Neugeborenen-Amnions. Z. Zellforsch. **45**, 589—611 (1957).

—, W. Schmidt and P. Lemburg: Experimental electron- and lightmicroscopical studies on the function of the amnion-apparatus of the chick, the cat and the man. Anat. Anz. **108**, H. 18/24, 305—310 (1960).

—, u. R. Schröder: Histogenetische und funktionelle Studien von Epithel, Muskulatur- und Bindegewebsstruktur des Amnions vom Hühnchen und Menschen. Proc. 14. Internat. Congr. of Zoology, Copenhagen, 1953.

— — Über Vorkommen und Bedeutung von „Hofbauerzellen" außerhalb der Plazenta. Arch. Gynäk. **187**, 65—76 (1955).

— — Vergleichende Studien über Bau und Funktion des Amnions. Neue Befunde am menschlichen Amnion mit Einschluß seiner freien Bindegewebs- oder sogenannten Hofbauerzellen. Z. Anat. Entwickl.-Gesch. **119**, 7—33 (1955).

— — Vergleichende Studien über Bau und Funktion des Amnions. Das Amnion der Reptilien am Beispiel der Kreuzotter. Z. Zellforsch. **42**, 344—364 (1955).

— — Vergleichende Studien über Bau und Funktion des Amnions. Das Amnion der Säuger am Beispiel des Schafes. Z. Zellforsch. **43**, 48—63 (1955).

—, u. G. Simon-Kutscher: Verursachung des Hydramnions durch Sekretionsstörungen am Amnionepithel oder Resorptionsstörungen wegen fetaler Mißbildungen? Arch. Gynäk. **192**, 160—173 (1959).

Benirschke, K.: Gestation Transaction of the Fifth Conference, March 11, 12 and 13, 1958, Princeton, N. J.

Bourne, G.: Gestation Transaction of the Fifth Conference, March 11, 12 and 13, 1958, Princeton, N. J.

Friedberg, V.: Untersuchungen über die fetale Urinbildung. Gynaecologica (Basel) **140**, 35—45 (1955).

Grobben, C.: Lehrbuch der Zoologie, 9. Aufl. Marburg: N. G. Elwert 1917.

Martius, H.: Lehrbuch der Geburtshilfe, 4. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme 1959.

Newman, H. H., and J. T. Patterson: The Development of the Ninebanded Armadillo from the Primitive Streak Stage to Birth, with Especial Reference to the Question of Specific Polyembryony. J. Morph. **21**, 359—423 (1910).

Patterson, J. T.: Polyembryonic Development in Tatusia novemcincta. J. Morph. **24**, 559—684 (1913).

Petry, G.: Untersuchungen über den Bau des menschlichen Amnions. Z. Zellforsch. **44**, 225—262 (1956).

— Histotopographische und cytologische Studien an den Embryonalhüllen der Katze. Z. Zellforsch. **53**, 339—393 (1961).

Schröder, R., u. H. Bautzmann: Vergleichende Studien über Bau und Funktion des Amnions. Das Amnion der Reptilien bei Tropidonotus, Mabuia, Egernia, Tiliqua, Alligator und Gecko. Z. Zellforsch. **44**, 1—13 (1956).

Staubesand, J.: Der transzelluläre Stoffverkehr in elektronenmikroskopischer Sicht. Klin. Wschr. (1961, im Druck).

Thenius, E., u. H. Hofer: Stammesgeschichte der Säugetiere. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.

Wassermann, F.: Die lebendige Masse. In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, herausgeg. von W. v. Möllendorff, Bd. 1, Teil 2. Berlin: Springer 1929.

Prof. Dr. H. Bautzmann, Anatomisches Institut der Universität, Hamburg, Martinistr. 52

Zeitschrift für Zellforschung 55, 696—706 (1961)

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Gießen
(Direktor: Prof. Dr. H. Rollhäuser)

HISTOPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN MECHANISMUS DER SCHOCKWIRKUNG AUF DIE DURCHBLUTUNG DER RATTENNIERE*

Von

H. Rollhäuser und P. Santamaría-Arnáiz

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 2. August 1961)

Wird eine Ratte in einen Erregungs- und Angstzustand versetzt oder werden dem Tier durch mäßiges Quetschen einer Extremität Schmerzen zugefügt, so stellt sich unmittelbar eine Verlangsamung der Blutströmung in beiden Nieren ein. Einen Indikator für die Durchblutungsgeschwindigkeit der Niere haben wir in dem Ausscheidungsmuster der tubulären Phenolrotsekretion gefunden (Rollhäuser und Vogell 1960). Histophysiologische Untersuchungen über den zeitlichen Ablauf der Phenolsekretion in der unbeeinflußten Rattenniere (Rollhäuser 1960) haben ergeben, daß eine Ausscheidung des Farbstoffs 1 min nach intravenöser Injektion von 30 mg/kg Körpergewicht im wesentlichen in den gestreckten Abschnitten der Hauptstücke (Markstrahl und Außenstreifen des Markes) vonstatten geht. Die gewundenen Abschnitte der Hauptstücke sind teilweise ebenfalls an der Sekretion beteiligt, doch zeigt sich nie eine Ausscheidung in den proximalen, glomerulumnahen Abschnitten. Dieses normale Ausscheidungsbild ändert sich in charakteristischer Weise, wenn die Ratten unter „Schock"-Einflüssen stehen (Quetschen der hinteren Extremitäten mit einer Arterienklemme). Bei der gleichen Dosis Phenolrot (30 mg/kg) scheiden die distalen Hauptstücke im Außenstreifen 1 min nach der Injektion noch nicht aus. Erst nach $2^1/_2$ min setzt auch hier die Sekretion ein. Die um etwa 2 min verspätete Ausscheidung in den Endabschnitten der Hauptstücke erklärt sich daraus, daß diese am venösen Ende der Kapillarstrombahn liegen und daher bei verlangsamter Blutströmung erst zuletzt den Farbstoff angeboten bekommen. Im Schock ist ferner die normalerweise nach 10 min abgeschlossene Sekretion der Farbstoffmenge noch nach 15 min nicht beendet. Somit ist gesichert, daß im Schockzustand eine Minderdurchblutung der Nieren besteht. Dieser Befund ist von zahlreichen Autoren erhoben worden, nicht zuletzt in umfangreichen Untersuchungen von Lauson u. Mitarb. (1944) am Menschen. Die Frage, auf welchem Wege diese Minderdurchblutung induziert wird, ist bisher nicht eindeutig geklärt. Es können hierbei nervale und humorale Faktoren im Spiel sein.

Little, Green und Hawkins (1947) halten es nach ihren Befunden für unwahrscheinlich, daß im Tourniquet-Schock ein humoraler Mechanismus wirksam ist. In die gleiche Richtung weisen die Versuche von Taylor und Page (1949), die nach Rückenmarksdurchschneidung bei L 1 die initiale Schockwirkung deutlich verringert fanden. Andererseits gelingt es (Grupp 1957), bei Hunden durch Adrenalin in einer Dosis von 40 γ/kg Körpergewicht die Nierendurchblutung

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

vollkommen zum Erliegen zu bringen. SMITH (1951) berichtet über Clearance-Daten bei einem psychisch erregten Patienten. Die hierbei gewonnenen, von der Norm abweichenden Werte entsprachen in Größe und Richtung etwa denen, die sich bei einer Infusion von Adrenalin einstellen. Nach den Untersuchungen von VAN SLYKE (1948) über den Entblutungsschock beim Hund müssen zwei Phasen unterschieden werden, die jeweils durch einen besonderen Mechanismus ausgelöst werden: In der Initialphase, die etwa 15 min dauert, entsteht eine Minderdurchblutung der Niere durch Vasokonstriktion unter nervalen Einflüssen. Bei länger anhaltender Minderdurchblutung treten zunehmend Schädigungen der Tubuli in den Vordergrund, die unter urämischen Erscheinungen zum Tod führen können.

In der vorliegenden Arbeit soll nun geklärt werden, auf welche Weise bei der Ratte das Quetschen der Extremitäten akut zu einer Minderdurchblutung der Niere führt. Die erwähnten Angaben früherer Autoren gewähren hierfür einige Anhaltspunkte, sind aber für unseren speziellen Fall nicht genügend aufschlußreich. Einmal wegen unterschiedlicher Versuchstechnik, zum anderen, weil sich die Ergebnisse bei verschiedenen Tierspezies nicht ohne weiteres vergleichen lassen.

Es sei betont, daß wir ausschließlich das initiale Schockstadium untersucht haben. Länger anhaltende Schockzustände bleiben einstweilen außer Betracht.

Material und Methode

Versuchstiere: Ratten mit einem Gewicht um 200 g. Normale, stets gleiche Ernährung. Ein Schock- und Schmerzzustand von 2—5 min Dauer wurde gegebenenfalls bei den Tieren durch Abklemmen beider Hinterbeine mittels Arterienklemme hervorgerufen. Während des akuten Schocks Injektion von Phenolrotlösung (0,6%ig, p_H 7,8) in einer stets gleichen Dosis von 30 mg/kg Körpergewicht in die Schwanzvene. Konstante Injektionsdauer von 10 sec. Tötung der Tiere in allen Versuchen durch Nackenschlag genau 1 min nach Ende der Injektion. Schnelle Entnahme beider Nieren. Nach Exzision einer etwa 1 mm dicken Scheibe aus der Organmitte weitere Zerteilung in vier Sektoren zwecks Fixierung im Gefriertrocknungsverfahren. Paraffineinbettung im Vakuum. 20 μ dicke Serienschnitte. Hauptstückabschnitte, die Phenolrot sezernieren, heben sich durch karminrote Färbung ihrer Zellen von nicht sezernierenden Tubuli ab. Da bei der unbeeinflußten Niere 1 min nach Ende der Injektion die Farbstoffausscheidung ausnahmslos bis zu den distalen Enden sämtlicher Hauptstücke fortgeschritten ist (ROLLHÄUSER 1960), kann man die verlangsamte Durchblutung der Nieren infolge eines traumatischen Schocks stets daran erkennen, daß die distalen Hauptstückabschnitte im Außenstreifen des Markes 1 min nach der Injektion noch keine Rotfärbung zeigen (ROLLHÄUSER und VOGELL 1960). Nähere Einzelheiten zur Methodik bei ROLLHÄUSER (1957, 1960).

Befunde

Zunächst gingen wir der Frage nach, ob im initialen Schockstadium humorale Faktoren die Minderdurchblutung der Nieren verursachen.

1. Adrenalin

Es ist denkbar, daß ein Abklemmen der Extremitäten zu einer Adrenalinausschüttung führt und damit eventuell zu einer Vasokonstriktion der Nierengefäße. Daher wurden die Tiere vor der Phenolrotinjektion mit verschieden hohen Dosen von Adrenalin und Noradrenalin behandelt. Eine subkutane Applikation von 0,2—1,0 mg Adrenalin und Noradrenalin pro 200 g Ratte konnten die Tiere ohne Beeinträchtigung ihres Befindens ertragen. Nach 5—15 min wurde die Standardmenge Phenolrot injiziert. Die histologische Untersuchung ergab, daß die Hauptstücke 1 min nach der Injektion in ihren distalen Abschnitten den

Farbstoff intensiv ausscheiden und auch sehr zahlreiche gewundene Hauptstücke an der Sekretion beteiligt sind (Abb. 1). Bei zwei Ratten wurde die Ausscheidung unter sonst gleichen Bedingungen bereits 15 sec nach der Injektion untersucht. Auch hierbei war die Ausscheidung bis zu den Endabschnitten im Außenstreifen fortgeschritten. In keinem Fall gelang es, nach Adrenalinvorbehandlung ein Sekretionsmuster zu erhalten, wie es für den Schock typisch ist. Die Ausscheidung erscheint, besonders was die Beteiligung der gewundenen Hauptstücke anbelangt, intensiver als normal. Die bereits nach 15 sec vollentwickelte Farbstoffsekretion, die normalerweise erst nach 30 sec einsetzt, kann nur mit einer beschleunigten Durchblutung erklärt werden. Sie beruht offenbar auf der blutdrucksteigernden Wirkung des Adrenalins im Gesamtkreislauf. Der morphologische Ausdruck für die Drucksteigerung sind die in der unbehandelten Niere meist verschlossenen, unter Adrenalin nunmehr eröffneten, sehr zahlreichen Kapillaren, die besonders im Mark die gestreckten Tubuli annähernd zirkulär umspinnen. Sie sind im gefriergetrockneten und mit Caedax aufgehellten, dicken Schnitt als äußerst zarte rote Linien (Erythrozyten) sehr deutlich zu erkennen. Auch die Rindenkapillaren zeigen sich auf diese Weise gegenüber der Norm verstärkt durchblutet. Erweiterung der Vasa recta medullaria mit praller Erythrozytenfüllung, wie es für den Schockzustand charakteristisch ist, wird unter Adrenalin niemals beobachtet. Nach all dem kann kein Zweifel bestehen, daß Adrenalin wenigstens auf die Rattenniere gerade entgegengesetzt wirkt wie das Abklemmen der Extremitäten.

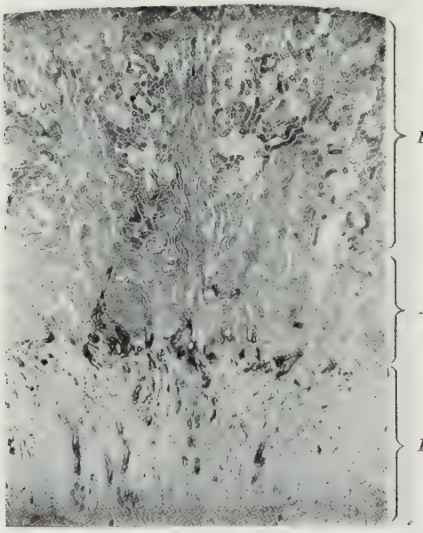


Abb. 1. Ausscheidungsbild der tubulären Phenolrotsekretion nach 0,5 mg Nor-Adrenalin s.c. Intensive Rotfärbung aller Hauptstücke sowohl in der Rinde wie im Außenstreifen des Marks und in den Markstrahlen. Massive Farbstoffniederschläge in den Sammelrohren (gut sichtbar im Gebiet des Innenstreifens). *R* Rinde, *AS* Außenstreifen, *IS* Innenstreifen. Vergr. 20 mal

2. Histamin

Beim Quetschen der Extremitäten könnte möglicherweise Histamin in Freiheit gesetzt werden. Mit höheren Histamindosen kann man bei adrenalektomierten Ratten einen Schockzustand mit kompletter Anurie erzielen. Bei normalen Ratten gelingt es indessen nicht (Jancsó 1955).

Subkutane Injektionen von Histamin bis zu 15 mg hatten nicht den geringsten Einfluß auf das Sekretionsmuster für Phenolrot. Somit kommt dieses Hormon als Ursache für eine Minderdurchblutung nicht in Betracht.

3. Azetylcholin

Da durch Adrenalin-Injektion die Wirkung des Schocks auf die Phenolrotausscheidung keineswegs nachgeahmt, sondern in ihr Gegenteil verkehrt wird,

wurden Versuche mit dem antagonistisch wirkenden Azetylcholin unternommen. Hohe Dosen Azetylcholinchlorid, 10—35 g/200 g Ratte, 5 min vor der Farbstoffinjektion intramuskulär gespritzt, bewirken eine Veränderung der Phenolrotausscheidung, die mit der unter Schockwirkung absolut identisch ist (Abb. 2). In keinem Versuch scheiden die gestreckten distalen Hauptstücke aus. Der Außenstreifen bleibt völlig farblos. Bei 30 mg intramuskulär zeigen sich Ausscheidungsdefekte, wie sie in solchem Maß im akuten Schock nicht beobachtet werden. Außer einzelnen Hauptstückabschnitten im Markstrahl sind lediglich einige gewundene Hauptstücke sekretorisch tätig. Auffallend ist, daß die kleinen Kapillaren im Außenstreifen kaum Erythrozyten enthalten und demnach schlecht durchblutet sind.

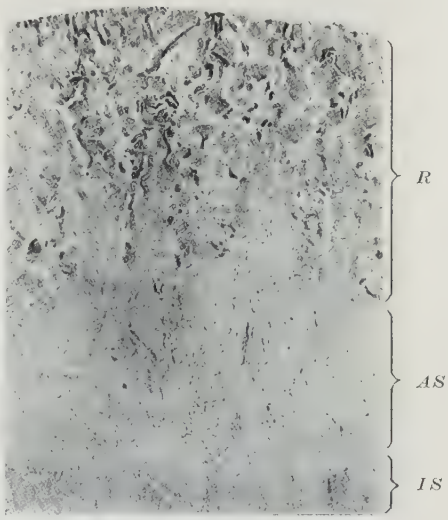


Abb. 2. Phenolrotausscheidung nach 33 mg Acetylcholinchlorid i.m. Teils schwache, teils sehr starke Rotfärbung der gewundenen Hauptstücke in der Rinde. Keine Anfärbung der gestreckten Hauptstückabschnitte im Außenstreifen. Keine Farbstoffniederschläge in den Sammelrohren. Bezeichnungen wie in Abb. 1. Vergr. 20mal

Die Tiere vertragen das Azetylcholin in hoher Dosierung schlecht. Ihre Aktivität ist stark herabgesetzt und die Herzfrequenz verlangsamt. Darin kommt die Azetylcholinwirkung auf den Gesamtkreislauf zum Ausdruck. Eine allgemeine Blutdrucksenkung und ein verringertes Minutenvolumen bewirken sicher auch in der Niere eine verzögerte Blutströmung und damit eine verzögerte Phenolrotsekretion.

Obgleich die Einflüsse des Azetylcholins und des Schocks auf die Phenolrotsekretion sehr ähnlich sind, erscheint es doch äußerst unwahrscheinlich, daß durch das Abklemmen der Extremitäten in kurzer Zeit eine so große Menge Azetylcholin ausgeschüttet wird, daß eine Minderdurchblutung der Nieren einsetzt. Immerhin besteht noch die Möglichkeit, daß die Niere nicht humoral, sondern über parasympathische Nervenbahnen direkt beeinflußt wird. Eine parasympathische Versorgung der Niere ist zwar bei keiner Säugetierspezies nachgewiesen (Ch. F. Bridgmann; A. Kuntz; H. W. Magoun; W. M. Rogers), doch wurde in weiteren Versuchen, um sicherzugehen, der Vagus beiderseits durchschnitten. (Beide Vagi wurden in Äthernarkose am Bauchteil des Ösophagus aufgesucht und kurz unterhalb des Zwerchfells durchtrennt.) Eine Woche nach der Operation wurde die Phenolrotausscheidung während der Extremitätenquetschung untersucht.

Ergebnis: Die Vagotomie ändert nichts an der Wirkung des Schocks auf die Nieren. Der Außenstreifen bleibt farbstofffrei. Damit kann eine Beeinflussung der Nierendurchblutung über den Vagus ausgeschlossen werden.

Insgesamt betrachtet, kann keiner der angewandten Wirkstoffe zur Erklärung der verlangsamten Blutströmung bei der „Schockniere" herangezogen werden.

Denervierungsversuche

Um zu ermitteln, ob nervale Einflüsse im Schock eine Rolle spielen, wurde einseitig, in den meisten Versuchen links, das Bindegewebe und damit die Nervengeflechte in der Umgebung der Nierengefäße schonend entfernt, bis Arterie und Vene über eine etwa 3 mm lange Strecke freilagen. Die Ratten überstehen den Eingriff ohne Komplikationen. Eine Woche nach der Operation wurde die Ausscheidung während des Schocks untersucht. Das Ergebnis ist in allen Fällen überraschend eindeutig: Die denervierte Niere zeigt ein völlig normales Ausscheidungsbild, als sei sie der Schockwirkung entzogen. Die gestreckten Haupt-

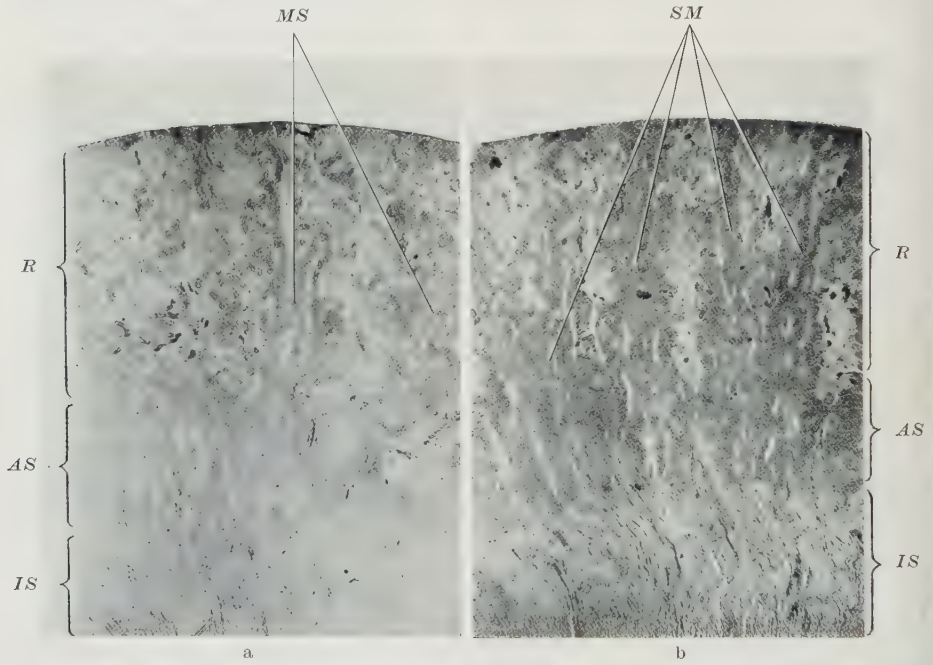


Abb. 3a u. b. Ausscheidungsbild nach Denervierung der linken Niere (Entfernung der perivasalen Geflechte). a Intakte Niere. Nach Quetschen der Hinterextremitäten Ausscheidungsdefekte vornehmlich im Außenstreifen. b Denervierte Niere. Normales Ausscheidungsmuster. Schockeinflüsse aufgehoben. Vergr. 20mal

stücke im Außenstreifen und in den Markstrahlen sezernieren intensiv, auch die gewundenen Hauptstücke in der Rinde sind über längere Strecken rot angefärbt. Die nicht denervierte Niere der anderen Seite läßt dagegen alle bereits geschilderten Kriterien einer Schockwirkung erkennen (Abb. 3a und b).

Diese Befunde beweisen, daß 1. das vegetative Nervensystem für die Schockeinflüsse auf die Niere maßgebend ist, daß 2. die verlangsamte Durchblutung im Schock durch lokale Widerstandserhöhung im Nierenkreislauf, d. h. durch neurogene Vasokonstriktion verursacht wird, und daß 3. humorale Mechanismen mit allgemeiner Kreislaufwirkung auszuschließen sind. Wären humorale Faktoren beteiligt, so bliebe es unverständlich, daß die *denervierte* Niere in ihrem Ausscheidungsmuster genau einer unbeeinflußten, normalen Niere gleicht.

Da der Vagus, wie im vorigen Abschnitt dargelegt, nicht an der Innervation der Niere teil hat, käme für die Übertragung der Schockwirkung nur der Sym-

pathikus in Betracht. Der nächste Schritt war daher eine Durchtrennung des Splanchnikus auf einer Seite. Aus rein technischen Gründen wurde der linke Splanchnikus exzidiert. Er ist nach seinem Durchtritt durch das Zwerchfell leichter zu erreichen als der rechte, bei dessen Präparation die Leber im Wege liegt. Außerdem wurde zur Sicherheit der größte Teil des Plexus solaris links entfernt. Die Splanchnikotomie wie auch die Entfernung der perivasalen Geflechte hat keinerlei Einfluß auf die Nierendurchblutung, wenn die Versuchstiere

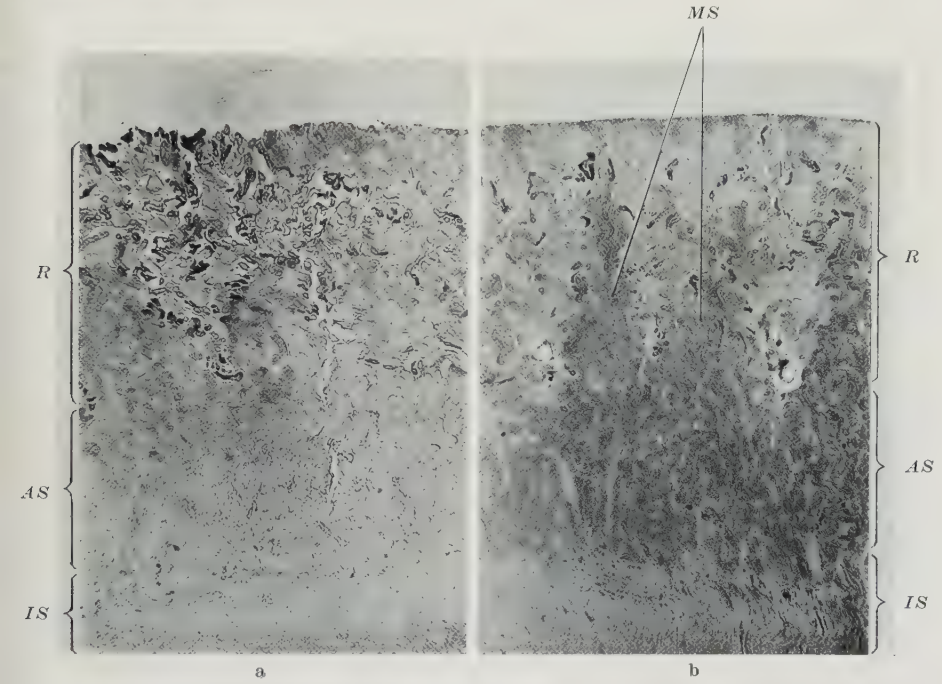


Abb. 4a u. b. Ausscheidungsbild während eines Schocks nach vorheriger Splanchnicotomie links. a Rechte Niere zeigt schwere Ausscheidungsdefekte (Außenstreifen). b Linke Niere zeigt völlig normale Sekretion. Schockeinflüsse aufgehoben. Vergr. 20mal

nicht alteriert sind. Die Phenolrotausscheidung zeigt eine Woche nach der Operation beiderseits das gleiche Muster. Daß die Durchblutung nach einseitiger Splanchnikotomie oder Denervierung in beiden Nieren unverändert normal bleibt, stimmt mit den Angaben von Bykow und Alexejew-Berkmann (1931), Klisiecki u. Mitarb. (1933), Rhoads u. Mitarb. (1934) sowie Smith u. Mitarb. (1939) überein. Demnach existiert keine dauernde tonische Innervation der Nierengefäße unter normalen Bedingungen. Im Schockzustand dagegen wird in allen Fällen die Minderdurchblutung bei einseitiger Durchtrennung des Splanchnikus auf der operierten Seite aufgehoben. Die Befunde (Abb. 4a und b) sind die gleichen wie nach einseitiger Denervierung. Daraus ergibt sich, daß die vasokonstriktorischen Impulse über den Splanchnikus vom Thorakalmark in die Peripherie geleitet werden und daß ferner die sympathische Niereninnervation ipsilateral erfolgt.

Damit erhebt sich die Frage, auf welchem Wege die Ursprungszellen des Splanchnikus durch die Extremitätenquetschung erregt werden. Es ist möglich,

daß die afferenten Impulse auf den Splanchnikus in Form eines spinalen somatovisceralen Reflexes übergeleitet werden. In diesem Fall müßte eine Quetschung der hinteren Extremität auch dann zur Minderdurchblutung der Niere führen, wenn das Rückenmark oberhalb des Splanchnikusursprungs, etwa in Höhe von Th 1, quer durchtrennt ist. Sofern der Reflexbogen in höheren Abschnitten, im Hirnstamm oder gar im Endhirn geschlossen wird, hätte eine Rückenmarkdurchtrennung bei Th 1 unter allen Umständen eine Unterbrechung der Afferenzen und Efferenzen zur Folge.

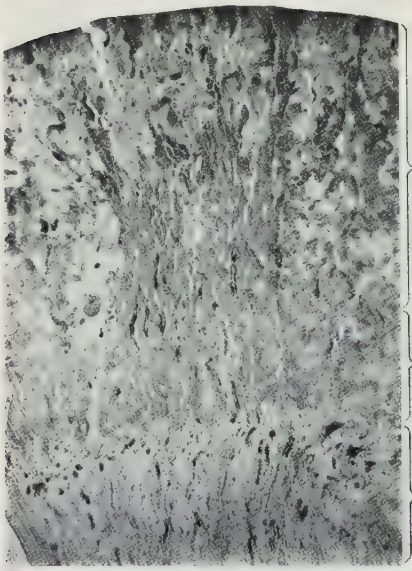


Abb. 5. Ausscheidungsmuster nach Koagulation des Archicortex beiderseits. Die Schockwirkung ist aufgehoben, die Niere scheidet trotz Abklemmen der Hinterextremitäten normal aus. Vergr. 20 mal

Bei drei Versuchstieren wurde das Rückenmark in Höhe von Th 1 und Th 2 durchschnitten. Die aktive Motorik in den hinteren Extremitäten und im Schwanz ist danach erloschen. Spinale Reflexe (Fluchtreflex bei Kneifen der Pfoten, Schwanzreflexe) bleiben erhalten. Eine Woche nach der Operation wurden Phenolrotversuche nach Quetschung in der üblichen Weise vorgenommen. Die Phenolrotsekretion im Schockzustand unterscheidet sich in keiner Beziehung von einer Normalausscheidung. Sekretionsverzögerung in den distalen Hauptstücken wird nicht beobachtet. Der Ausfall dieser Versuche spricht ganz eindeutig dafür, daß spinale Reflexe keine Rolle spielen und die Erregung der Splanchnikusneurone von höheren Hirnzentren aus erfolgt. Hierfür käme zunächst der ganze Hirnstamm, von der Medulla bis zum Zwischenhirn, in Betracht. Doch ist nicht auszuschließen, daß auch das Endhirn wegen seiner vielfachen reziproken Verbindungen zum Thalamus und Hypothalamus als Integrationsort fungiert.

In Ermangelung eines stereotaktischen Apparates für Operationen am Rattengehirn wurde in einer nächsten Versuchsserie der nach Abnahme der Schädeldecke gut zugängliche Archicortex im Bereich der medialen Hemisphärenflächen oberhalb des Balkens beiderseits elektrisch koaguliert. Die operierten Tiere zeigten danach charakteristische Veränderungen in ihrer Verhaltensweise. Sie verlieren ihre sonst so ausgesprochene Aggressivität. Eine normale junge Ratte quietscht, wenn man sie in den Schwanz kneift, wendet sich blitzschnell um und versucht, mit Beißen sich der Peinigung zu erwehren. Sie flieht, wenn man sie etwas unzart ergreifen will, besonders dann, wenn sie durch irgend eine vorausgegangene Operation erfahren hat, daß der weiße Kittel des Häschers für sie nichts Gutes bedeutet. Nach Zerstörung des Archicortex werden die Ratten zahm und indifferent. Das Schwanzkneifen alteriert sie nicht sonderlich. Sie machen gar nicht erst den Versuch zu beißen, sondern begnügen sich mit ein

paar Schritten Flucht geradeaus, ohne je zu quietschen. Diese Tiere verhalten sich ungewöhnlich ruhig und friedlich. Ihre sonst typische Aktivität ist einer lethargischen Passivität gewichen.

Nach dem widerstandslos erduldeten Abklemmen der Hinterextremitäten zeigt sich bei diesen Tieren, daß die Phenolrotausscheidung in beiden Nieren völlig normal ist. Es finden sich keine Unterschiede gegenüber der unbeeinflußten Sekretion (Abb. 5).

Die Läsion eines Rindenareals, durch die das emotionale Verhalten der Tiere im Sinne einer Indolenz gegenüber Umwelteinflüssen verändert wird, führt also gleichzeitig zu einer Unterbrechung der Erregungen, die über den Splanchnikus eine Konstriktion der Nierengefäße bewirken.

Diskussion und Befunde

Es wäre zunächst zu überlegen, ob die Durchblutungsgeschwindigkeit der Niere, gemessen durch das Ausscheidungsmuster für Phenolrot, etwas über die hämodynamischen Faktoren und ihre Änderungen auszusagen erlaubt.

Nach dem Hagen-Poiseuilleschen Gesetz hängt das Stromvolumen V pro Zeiteinheit bei konstanter Viskosität von der Druckdifferenz Δp (arteriovenöse Druckdifferenz) und dem Gefäßradius ab:

$$V/t = \Delta p \cdot r^4 \cdot \text{konst}$$

Die Strömungsgeschwindigkeit v ergibt sich durch Division durch den Gefäßquerschnitt:

$$v = \Delta p \cdot r^2 \cdot \text{konst}$$

Aus den Gleichungen ergibt sich, daß eine Änderung des *Druckgefälles* in der Nierenstrombahn mit der Bestimmung der Stromgeschwindigkeit ebenso gut erfaßt werden kann wie mit dem Stromvolumen (in beiden Fällen direkte Proportionalität). Hingegen muß sich eine *Radiusänderung* der Nierengefäße auf das Stromvolumen theoretisch stärker auswirken als auf die Strömungsgeschwindigkeit. Eine Radiusänderung kann also mit der Bestimmung des Stromvolumens (z.B. p-Aminohippursäure-Clearance) genauer festgestellt werden. Das gilt allerdings nur, wenn sich die Radiusänderung auf das gesamte Stromgebiet der Niere erstreckt, da die Clearance lediglich über die Gesamtdurchblutung Auskunft geben kann. Ob einzelne Gefäßprovinzen innerhalb einer Niere vermindert durchblutet werden, kann mit der Clearance nicht sicher ermittelt werden. Hier ist der direkte Nachweis der Geschwindigkeit der Blutzufuhr zu bestimmten Organregionen geeigneter. In dieser Hinsicht sind die Untersuchungen von Thurau und Kramer (1959a, b) über die Kreislaufzeiten in der Rinde und im Mark der Hundeniere aufschlußreich. Es zeigt sich, daß die mittleren Kreislaufzeiten in der Rinde nicht nur erheblich kürzer als im Mark sind, sondern unter verschiedenen Versuchsbedingungen auch praktisch gleich bleiben. Die Geschwindigkeit der Markdurchblutung variiert viel stärker. In Versuchen mit verschieden hohen Perfusionsdrucken waren die Nieren denerviert. Die Konstanz der Rindendurchblutung ist somit eine Eigenleistung des Nierengefäßsystems (sog. Autonomie des Nierenkreislaufs). Das bedeutet indessen nicht, daß sich die Gefäße in der intakten Niere nicht auf einen Nervenreiz hin kontrahieren können. Die Autonomie

wird gewissermaßen durch neurogene Vasokonstriktion überlagert. Bei unseren Schockversuchen sind wesentliche Unterschiede in der Sekretion vor allem im Außenstreifen (subkortikale Markzone) deutlich, während bestimmte Hauptstückabschnitte in der Rinde auch im Schockzustand prompt ausscheiden. Nun liegt zwar zwischen der mikroskopisch nachweisbaren Rotfärbung einer sezernierenden Zelle und der Ankunft des farbstoffhaltigen Blutes in den peritubulären Kapillaren wegen der nötigen Anreicherung des Farbstoffs in der Zelle ein gewisses Intervall. Nimmt man jedoch an, daß dieses Intervall bei den Tubuli in Rinde und Außenstreifen gleich ist, so läßt sich zweifellos aus dem zeitlichen Ablauf der Rotfärbung in den Hauptstücken für die Durchblutungsgeschwindigkeit in verschiedenen Nierenzonen ein Anhalt gewinnen.

Es wurde festgestellt, daß die Minderdurchblutung der Rattenniere während des Schmerzzustandes durch neurogene Vasokonstriktion zustande kommt. Auf die gleiche Weise entsteht nach den Untersuchungen von Balint u. Mitarb. (1954) eine schwere Durchblutungsstörung der Hundenieren nach Entnahme größerer Blutmengen. Wird eine Niere an die Halsgefäße angeschlossen, womit sie denerviert ist, so bleibt ihre Funktion trotz Entblutungsschock praktisch gleich. Die Durchblutungsstörung der anderen, nicht transplantierten Niere wird alsbald aufgehoben, wenn das Rückenmark zwischen Th 2 und Th 5 durchtrennt wird. An dem Einfluß des Gehirns auf die sympathische Innervation der Nierengefäße besteht demnach kein Zweifel.

Die Frage ist nur: welche Rolle spielt dabei der Hirnstamm (Hypothalamus, Formatio reticularis, Medulla) welche der Cortex, auf welchen Bahnen verläuft die Erregungsleitung ? Bei der Zerstörung des Archicortex wurden sensible Bahnen an keiner Stelle durchtrennt. Wenn man einer Ratte eine der menschlichen analoge Schmerzempfindung zumessen will, so sollte das Versuchstier den Schmerz bei der Extremitätenquetschung empfinden. Da die Durchblutungsstörung der Nieren nach Abtragung von Teilen des Archicortex sistiert, darf angenommen werden, daß eine vom Schmerz untrennbare emotionale Komponente die Vasokonstriktion auslöst. Daß hierbei auch der Hirnstamm beteiligt ist, legen die Ergebnisse nahe, die wir mit verschiedenen Pharmaka erzielten. Die Vasokonstriktion während des Quetschens läßt sich ausschalten durch Injektion von Phenothiazinderivaten (Atosil, Megaphen) oder Librium. Da diese emotional dämpfenden Mittel eine breite Wirkungsbasis im Hirnstamm haben, ist es nicht möglich, die am Nierengefäßreflex beteiligten Nervenbahnen und -zentren detaillierter zu bestimmen. Wir hoffen, durch weitere Versuche mit stereotaktischen Eingriffen am Gehirn in diese Zusammenhänge einige Einblicke gewinnen zu können.

Zusammenfassung

Es sollte geklärt werden, auf welche Weise ein Schock- und Schmerzzustand (kurzes Abklemmen der Hinterextremitäten) akut zu einer Minderdurchblutung der Rattenniere führt. Als morphologisches Kriterium für eine verlangsamte Blutströmung diente die früher beobachtete Verspätung der Phenolrotsekretion in den distalen gestreckten Hauptstückteilen.

Humorale Mechanismen konnten ausgeschlossen werden: Adrenalin und Noradrenalin bewirkten selbst in höchsten Dosen eine beschleunigte Durchblutung der Rattennieren. Histamin hatte keinerlei Einfluß auf die Strömungsgeschwindig-

keit. Mit hohen Dosen Azetylcholin gelang es, ähnliche Ausscheidungsdefekte wie im Schock zu erzielen, doch beruht dies vorwiegend auf einer allgemeinen Blutdrucksenkung.

Nach Entfernung des perivasalen Nervenplexus der Nierengefäße war die Phenolrotausscheidung während des Schocks auf der operierten Seite normal, in der intakten Niere in üblicher Weise verzögert. Dieser Befund spricht für eine *neurogene Vasokonstriktion* und gegen humorale Faktoren. Die Efferenzen laufen über den Splanchnikus. Seine Durchschneidung hat die gleichen Folgen wie die Entfernung der perivaskulären Geflechte.

Rückenmarkdurchtrennung bei Th 1 oder Th 2 verhindert ebenfalls die neurogene Vasokonstriktion. Da nach beiderseitiger Zerstörung des Archicortex oberhalb des Balkens die Schockwirkung auf die Nierendurchblutung gebremst wird, zugleich auch ein Affektivitätsverlust bei den Tieren eintritt, ist offenbar die emotionale Komponente des Schmerzes für die Vasokonstriktion maßgebend. Daß der Hirnstamm dabei beteiligt ist, geht aus der schockblockierenden Wirkung der emotional dämpfenden Phenothiazinderivate hervor.

Literatur

Bridgmann, Ch. F., A. Kuntz, H. W. Magoun and W. M. Rogers: Angegeben in Handbook of biological data. Springfield, Ohio: Carpenter Litho & Prtg. Co. 1956.

Bykow, K. M., u. I. A. Alexejew-Berkmann: Die Ausbildung bedingter Reflexe auf die Harnausscheidung. II. Bedingte Reflexe bei denervierter Niere. Pflügers Arch. ges. Physiol. **227**, 301—327 (1931).

Grupp, G.: Die Wirkung von Adrenalin und Noradrenalin auf die Wärmebildung und Durchblutung der Hundeniere. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **232**, 532—533 (1957).

Jancsó, N.: Speicherung. Stoffanreicherung im Reticuloendothel und in der Niere. Budapest: Akadémiai Kiadó 1955.

Klisiecki, A., M. Pickford, P. Rothschild and E. B. Verney: The absorption and excretion of water by the mammal. Relation between absorption of water and its excretion by innervated and denervated kidney. Proc. roy. Soc. B **112**, 496—520 (1933).

Lauson, H. D., S. E. Bradley and A. Cournand: The renal circulation in shock. J. clin. Invest. **23**, 381—402 (1944).

Little, J. M., H. D. Green and J. E. Hawkins jr.: Evidence from crosstransfusion experiments that the diminished urine flow accompanying ischemic compression shock is not due to humoral factors. Amer. J. Physiol. **151**, 554—563 (1947).

Rhoads, C. P., D. D. van Slyke, A. Hiller and A. S. Alving: The effect of novocainization and total section of the nerves of the renal pedicle on renal blood flow and function. Amer. J. Physiol. **110**, 392—398 (1934).

Rollhäuser, H.: Histologische und cytologische Untersuchungen über den Mechanismus der tubulären Farbstoff-Ausscheidung in der Rattenniere. Z. Zellforsch. **46**, 52—66 (1957).

— Untersuchungen über den örtlichen und zeitlichen Ablauf der Phenolrotausscheidung in den Tubuli der unbeeinflußten Rattenniere. Z. Zellforsch. **51**, 348—355 (1960).

—, u. W. Vogell: Die tubuläre Phenolrotausscheidung und die Feinstrukturveränderungen der Glomerula bei der Rattenniere im traumatischen Schock. Z. Zellforsch. **52**, 549 bis 566 (1960).

Slyke, D. D. van: Effects of shock on kidney. Ann. intern. Med. **28**, 701—722 (1948).

Smith, H. W.: The kidney. Structure and function in health and disease. New York: Oxford University Press 1951.

— E. A. Rovenstine, W. Goldring, H. Chasis and H. A. Ranges: The effects of spinal anesthesia on the circulation in normal, unoperated man with reference to the autonomy of the arterioles, and especially those of the renal circulation. J. clin. Invest. **18**, 319—338 (1939).

Taylor, R. D., and I. H. Page: Origin of renal vasoconstriction in tourniquet shock. Fed. Proc. 8, 155 (1949).

Thurau, K., P. Deetjen u. K. Kramer: Hämodynamik des Nierenmarks. II. Wechselbeziehung zwischen vasculärem und tubulärem Gegenstromsystem bei arteriellen Drucksteigerungen, Wasserdiurese und osmotischer Diurese. Pflügers Arch. **270**, 270—285 (1960).

— u. K. Kramer: Die Reaktionsweise der glatten Muskulatur der Nierengefäße auf Dehnungsreize und ihre Bedeutung für die Autoregulation des Nierenkreislaufes. Pflügers Arch. ges. Physiol. **268**, 188—203 (1959).

— — Weitere Untersuchungen zur myogenen Natur der Autoregulation des Nierenkreislaufs. Aufhebung der Autoregulation durch muskulotrope Substanzen und druckpassives Verhalten des Glomerulusfiltrates. Pflügers Arch. ges. Physiol. **269**, 77—93 (1959).

Prof. Dr. H. Rollhäuser, Dr. P. Santamaría-Arnáiz,
Anatomisches Institut der Universität Gießen, Friedrichstr. 24

Zeitschrift für Zellforschung 55, 707—723 (1961)

Aus dem Institut für Angewandte Zoologie der Universität Würzburg
(Vorstand: Prof. Dr. K. Gösswald)

SEKRETIONSPHASEN UND CYTOLOGISCHE BEOBACHTUNGEN ZUR FUNKTION DER OENOCYTEN WÄHREND DER PUPPENPHASE VERSCHIEDENER KASTEN UND GESCHLECHTER VON *FORMICA POLYCTENA* FOERST. (INS. HYM. FORM.)

Von

Gerhard H. Schmidt

Mit 12 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. Juni 1961)

Inhalt

Seite

Einleitung 707
Methodik 708
Untersuchungsergebnisse 709
I. Lage der Oenocyten im Körper 709
II. Aktivitätsphasen und Generationswechsel 710
III. Cytologische Beobachtungen 713
1. Farbe und Färbung S. 713. — 2. Form und Größe S. 713. — 3. Sekretion S. 715. — 4. Zell- und Kernvermehrung S. 715. — 5. Speicherung von Reservestoffen S. 718.
Zur Funktion der Oenocyten 718
Zur hormonalen Beeinflussung der Oenocyten 720
Zusammenfassung 720
Literatur 721

Einleitung

Ein umfangreiches Studium der histologischen Differenzierung sowie der physiologischen und biochemischen Prozesse während der Postembryonalentwicklung der Ameisen lieferte interessante Beobachtungen über die Oenocyten und ihre eventuelle Bedeutung im Metamorphosegeschehen. Obgleich diese von Fabre (1856) entdeckten Zellen Untersuchungsobjekt zahlreicher Forscher waren, ist ihre Bedeutung im Stoffwechsel während der Metamorphose der Insekten noch weitgehend ungeklärt.

Die von Wielowiejski (1886) als Oenocyten bezeichneten Zellen lassen sich durch ihre Größe, die starke Affinität ihres Cytoplasmas zu Farbstoffen und manchmal gelbliche Färbung als ektodermale Gebilde von den anderen mesodermalen Geweben in der Körperhöhle der Insekten unterscheiden. In ihrer Art sind sie nur den Insekten eigen und wurden bei fast allen untersuchten Spezies gefunden; nur bei den Thysanuren konnte Wheeler (1892) sie nicht feststellen.

Die Oenocyten entstehen bereits während der Embryonalentwicklung durch Vergrößerung metamerer Gruppen von Zellen des Ektoderms. Während der Larvenperiode beobachtet man sie im ventro-lateralen Bereich der Abdominalsegmente in der Nähe der Stigmen (Wheeler 1892, Stendell 1912) oder sie liegen zwischen Muskeln und Körperwand in Gruppen (Pantel 1898). Wenn sie auch häufig in Verbindung mit der Epidermis bleiben (Wielowiejski 1886,

WHEELER 1898, WILLERS 1916, POISSON 1924, WIGGLESWORTH 1933, OCHSE 1946), so können sie sich bei vielen Insekten, besonders bei Coleopteren, auch loslösen, in das Speichergewebe einwandern und dort mit den Trophocyten verschmelzen (KREMER 1925 und 1926, ALBRO 1930, MURRAY und TIEGS 1935); bei Geotrupes (WIELOWIEJSKI 1886), Aphiden (WHEELER 1892), adulten Musciden und besonders Hymenopteren (BERLESE 1899, KOSCHEVNIKOW 1900, PERÉZ 1903, 1910 und 1911, WIGGLESWORTH 1933, THOMSEN 1956) sollen sie verstreut im Speichergewebe liegen. Im einzelnen sei auf die Auswertung der älteren Oenocytenliteratur von KOCH (1944) verwiesen.

Aus dem Schrifttum geht hervor, daß die Oenocyten bei vielen Insekten keinen festen Platz im Körper haben, sondern wenigstens periodisch auch in der Hämolymphe transportiert werden können oder sich amöboid durch die Hämolymphe bewegen. Von den meisten untersuchten Insektenarten ist eine larvale und eine imaginale Oenocytengeneration bekannt. Die larvalen Oenocyten gehen während der Puppenphase zugrunde und werden durch imaginale, die meistens wiederum von der Epidermis abgegliedert werden, ersetzt. Wie die larvalen Oenocyten letztlich abgebaut werden, ist bisher unklar. Es gibt eine Reihe von weitgehend differierenden Beobachtungen (KOSCHEVNIKOW 1900, PERÉZ 1901, POYARKOFF 1910, KREMER 1926, ALBRO 1930, OCHSE 1944, RISLER 1954).

Wegen ihrer weiten Verbreitung und der meistens deutlich erkennbaren Funktionsphasen hat man den Oenocyten die verschiedensten Funktionen zugesprochen. Die deutlich zu beobachtenden Kern- und Zellveränderungen lassen nicht daran zweifeln, daß ihnen während der Metamorphose eine besondere Bedeutung zukommt. Wieweit die in der Literatur in Betracht gezogenen Funktionen, wie Exkretion, Speicherfunktion, Beteiligung am intermediären Stoffwechsel, hormonale und im Zusammenhang mit den Häutungen stehende Funktionen, Bildung von kutikulären Lipoproteiden u. ä., für die Oenocyten der Ameisen zutreffen, soll, abgesehen von einigen cytologischen Beobachtungen, nachstehend näher erläutert werden.

Methodik

Während der Puppenphase wurden in Abständen von 24—48 Std bei 28° C erhaltene verschiedene Entwicklungsstadien von Männchen, Weibchen und Arbeiterinnen von *F. polyctena* FOERST. nach CARNOY oder in 8%igem Formol fixiert. Von den in Formol fixierten Objekten wurden nach Gelatine-Einbettung Gefrierschnitte angefertigt (SCHMIDT 1959) und eine Fettfärbung mit Sudan III sowie eine Proteingegenfärbung mit Bromphenolblau nach MAZIA u. Mitarb. (1953) durchgeführt. Die in Carnoyschem Gemisch fixierten Objekte wurden in Paraffin eingebettet; Serienschnitte. Färbungen: Hämalaun-Eosin, Hämalaun-Carmin nach BEST zur Glykogenfärbung (vgl. ROMEIS 1948).

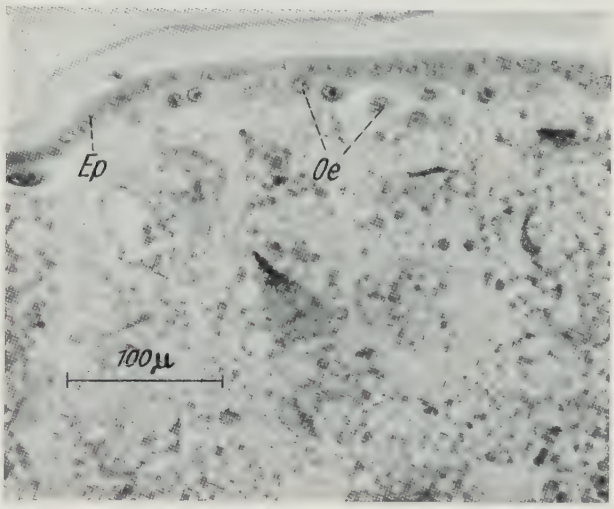
Zur Vitaluntersuchung der Oenocyten wurde Hämolymphe oder Speichergewebe entnommen und direkt auf dem Objektträger mit dem Phasenkontrastmikroskop betrachtet. Diese Untersuchungen gelingen besonders leicht bei noch nicht pigmentierten Puppen, weil zu dieser Zeit die Oenocyten frei in der Hämolymphe liegen. Mit Vitalfarbstoffen und Indikatoren verschiedenster Art (Merck-Kollektion) wurden die Zellen teilweise angefärbt und der pH-Wert ermittelt.

Ein sorgfältiges Studium der äußeren Metamorphose macht eine Thermostat-Entwicklung unnötig. Man kann dann nämlich, auch ohne die Entwicklungsdauer zu kennen, jedes Entwicklungsstadium so genau einstufen, daß bei vergleichenden histologischen und physiologischen Untersuchungen die gleichen Resultate erhalten werden wie nach einer genauen experimentellen Festlegung der Entwicklungszeit der einzelnen Stadien. Dabei ist Voraussetzung, daß zunächst die Gesamtdauer der Puppenentwicklung festgelegt und während dieser Zeit die äußere Metamorphose genau verfolgt wurde.

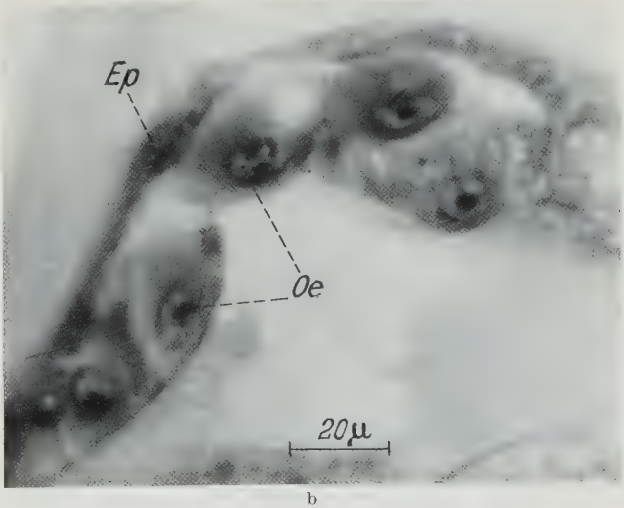
Untersuchungsergebnisse

I. Lage der Oenocyten im Körper

Auch bei *Formica* werden die Oenocyten ventro-lateral von den ektodermalen Anlagen gebildet. Während der Larvenphase bleiben sie bis zum Beginn der inneren Metamorphosevorgänge auf dem Vorpuppenstadium mit der Epidermis verbunden bzw. liegen ihr an (Abbildung 1a, b). Die übrige Körperhöhle ist zu diesen Zeiten frei von Oenocyten. Dies bestätigt die Befunde von Berlese (1899 u. 1902) bei den Ameisen *Tapinoma* und *Pheidole* und von Peréz (1903) bei *Formica rufa* L. Kurze Zeit vor der Puppenhäutung lösen sich die larvalen Oenocyten von der Epidermis los und beginnen zu wandern (vgl. auch Kramer 1959). Das die Wanderung auslösende Prinzip ist unbekannt. Die Zellen begeben sich durch die Hämolymphe an die Orte der Organbildung (Abb. 2). Während die larvalen Oenocyten von nun an stets frei in der Hämolymphe oder zwischen dem Speichergewebe und anderen Organen liegen, also keine Beziehung zum Tracheensystem zeigen (vgl. auch Weissenberg 1907, Gee 1911), findet man die imaginalen Oenocyten mit den Trophocyten verbunden nur im Speichergewebe (Abb. 3). In den weitaus meisten Fällen liegen die larvalen und imaginalen Oenocyten nach ihrer Loslösung von der Epidermis einzeln und verstreut.



a



b

Abb. 1a u. b. Lage der Oenocyten auf dem Larvenstadium (Weibchen; Altlarve, quer); Fixierung nach Carnoy, Färbung: Hämalaun-Eosin; *Oe* Oenocyten, *Ep* Epidermis. a Vergr. 180fach (Okk. 8×, Obj. 10/o. 25). b Vergr. 650fach (Okk. 8×, Obj. 40/o. 65)

II. Aktivitätsphasen und Generationswechsel

Während der Puppenphase beobachtet man verschiedene Aktivitätszustände der Oenocyten. In relativ kleinen, mit Hämalaun-Eosin sich homogen färbenden Zellen findet sich vielfach ein einheitlich dunkel kolorierter Kern. Diese Zellen liegen meistens etwas abseits von den Orten der Organbildung und flottieren in der Hämolymphe. Sie wurden während der Puppenphase besonders als larvale Oenocyten gefunden; imaginale Oenocyten zeigen diesen Zustand während der Metamorphose nur bei Männchen kurz vor der Imaginalhäutung (SCHMIDT 1962). Die meisten Zellen besitzen während der Metamorphose einen großen, vakuolisierten Kern. Die Zellen selbst können je nach Menge der später zu besprechenden gespeicherten Sekrete verschieden groß sein (Abbildung 4); auch die Zellkerngröße ist weitgehend abhängig von seiner Aktivität. Bei den kleinen Zellen mit nahezu pyknotischen Kernen handelt es sich um inaktive, nicht jedoch um degenerierende Oenocyten, wie deutlich beobachtet werden konnte, während diejenigen mit vakuolisiertem Kern und aufgelockertem Cytoplasma in Funktion sind. Untersuchungen über den Grad der Polyploidie durch Ermittlung der Kerngröße, wie sie KRAMER (1959) an Formiciden durchführte, verlieren wegen der Beteiligung der Kerne an der Sekretbildung und der dabei auftretenden Kernvergrößerungen — wenigstens zur Zeit der Sekretionsphase — an Bedeutung.

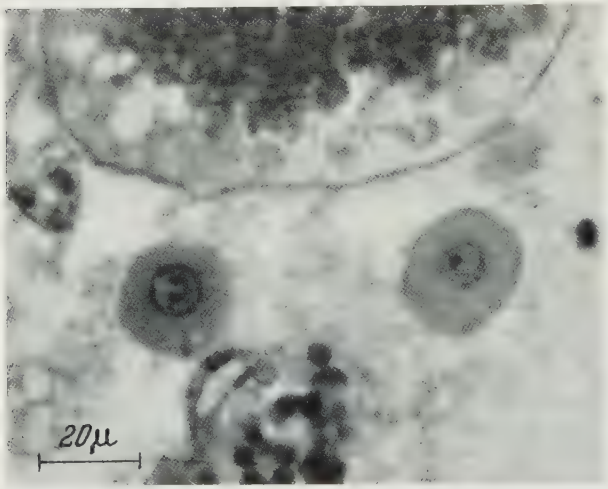


Abb. 2. Larvale weibliche Oenocyten kurz nach der Puppenhäutung; Fixierung nach CARNOY; Färbung: Hämalaun-Eosin, Vergr. 650fach (Okk. 8 ×, Obj. 40/o. 65)

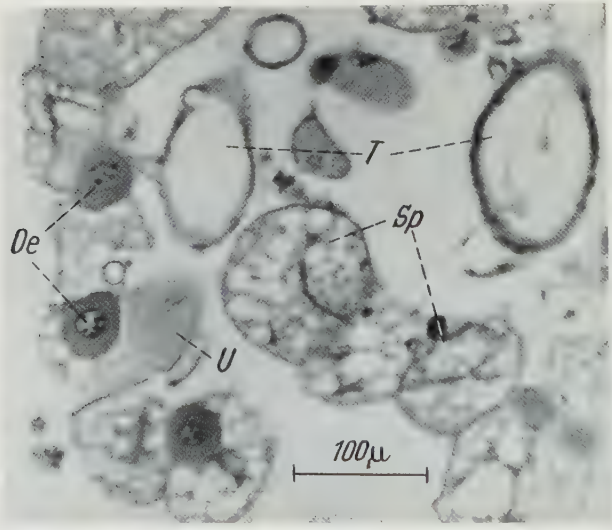


Abb. 3. Lage der imaginalen weiblichen Oenocyten im Speichergewebe; Entwicklungsstadium: stärkere Körperpigmentierung (etwa 3 Tage vor der Imaginalhäutung nach Abb. 5c); Fixierung nach CARNOY, Färbung: Hämalaun-Eosin, Vergr. 180fach (Okk. 8 ×, Obj. 10/o. 25); *Sp* Speicherzellen, *Oe* Oenocyten *T* Trachcen, *U* Uratzelle

Nach der Loslösung von der Epidermis wachsen die Oenocyten stark an. Sie erreichen im larvalen Zustand kurz vor bzw. nach der Puppenhäutung ein Maximum, um dann wieder an Größe abzunehmen. Die großen larvalen Oenocyten befinden sich besonders zahlreich im Thorax der Geschlechtstiere zur Zeit der Bildung der Flugmuskulatur. Ein Zusammenhang zwischen Oenocytenaktivität und dem Häutungsgeschehen konnte, wie auch Ochse (1946) von *Sialis* (Neuropt.) berichtet, bei *Formica* nicht festgestellt werden. Ist die Organausbildung weitgehend abgeschlossen, was kurz vor der Körperfärbung erreicht ist, entsteht die imaginale Oenocytengeneration, die vor der Imaginalhäutung ein Aktivitätsmaximum aufweist (Abb. 5). Die imaginalen Oenocyten sind ebenfalls epidermaler Herkunft (vgl. auch Glöckner 1954), während sie nach Poyarkoff (1910) und Kremer (1926) bei Chrysomeliden (Coleopt.) aus den larvalen Zellen entstehen sollen. Nach ihrer Einwanderung ins Speichergewebe wird dieses bisher larvale Gewebe zum imaginalen umgebaut und die Hämolymphe von Reservestoffbestandteilen befreit (vgl. auch Anglas 1901, Peréz 1901 und 1903, Schnelle 1923, Schmieder 1928, Oertel 1930).

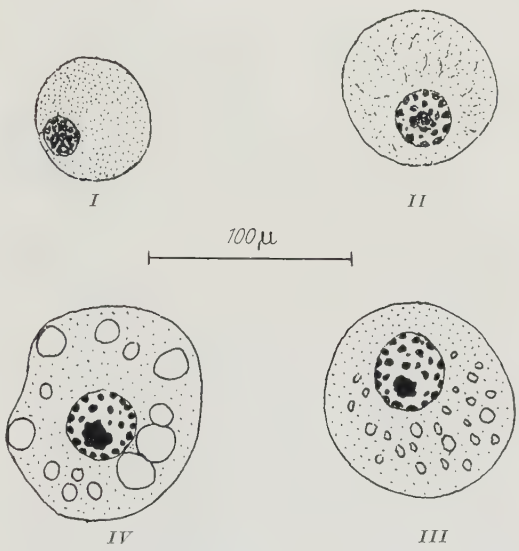


Abb. 4. Verschiedene gleichzeitig anzutreffende Funktionszustände larvaler weiblicher Oenocyten; Entwicklungsstadium: während der Puppenhäutung; *I* inaktive Zelle, *II* Zellaktivität beginnt, *III* während der Sekretbildung, Kern zeigt jetzt größtes Volumen, *IV* Ende der Sekretbildung, Kern verkleinert sich, Zellvolumen jetzt am größten

Nach Abb. 5a—c bestehen deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Geschlechtern und Kasten in der Oenocytenaktivität. Das Sekretionsmaximum der larvalen Zellen liegt bei Männchen kurz vor der Puppenhäutung, bei Weibchen dagegen erst nach der Puppenhäutung, was gegen eine Beziehung zu dieser Häutung spricht. Trotz der im Ruhezustand kleineren männlichen Oenocyten sind die Zellen zur Zeit des Sekretionsmaximums so groß wie die an sich größeren weiblichen. Ob diese stärkere Aktivität und Sekretbildung der männlichen Oenocyten mit der einhergehenden Hodendifferenzierung in Zusammenhang steht, bedarf näherer vergleichender Untersuchungen. Die Reifung der weiblichen Gonaden erfolgt nämlich erst wesentlich später.

Das Volumen der larvalen Oenocyten steigt bei den Geschlechtstieren steiler an als bei Arbeiterinnen. Dies hängt wahrscheinlich mit der einhergehenden Ausbildung der Flugmuskulatur bei Männchen und Weibchen zusammen. Die imaginalen Oenocyten erreichen bei Weibchen die weitaus stärkste Aktivität. Ähnliches beobachtete Kramer (1959) an den Oenocyten von *Lasius niger* L. und *Myrmica laevinodis* Nyl. Bei Männchen und Arbeiterinnen sind sie wesentlich kleiner als die larvalen Oenocyten. Die starke Oenocytenaktivität der Weibchen

vor der Imaginalhäutung steht sicherlich im Zusammenhang mit der Ovardifferenzierung. Einen Grö-

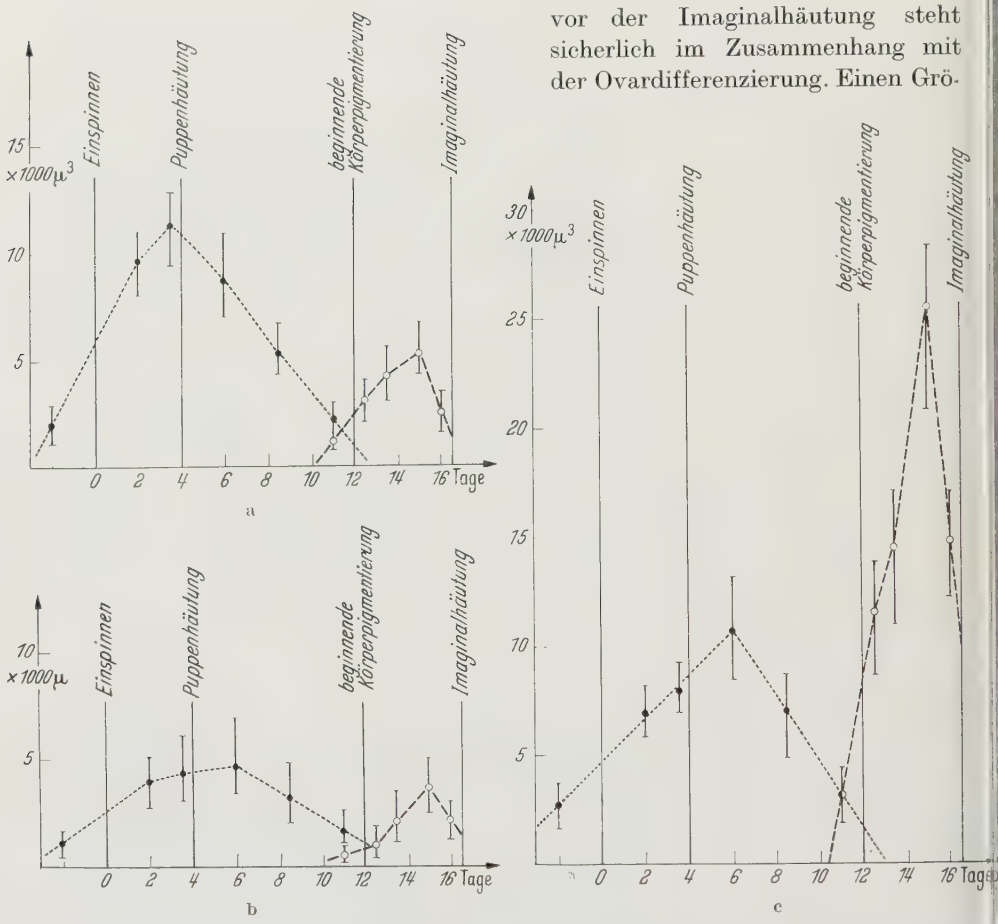


Abb. 5a—c. Aktivitätskurven von larvalen (· · · ● · · ·) und imaginalen (- - - ○ - - -) Oenocyten während der Puppenphase bei 28° C; zu jedem Mittelwert aus je 120 Zellen ist die mittlere Schwankungsbreite der Einzelwerte angegeben; Abszisse: Entwicklungszeit in Tagen, Ordinate: Oenocytenvolumen. a Männchen, b Arbeiterinnen, c Weibchen

Tabelle 1. *Größenvergleich der larvalen mit den imaginalen Oenocyten zur Zeit der Sekretionsmaxima* (Mittelwerte aus Abb. 5a—c)

	Volumen ($4/3\ \pi\ a\ b^2$)		Quotient $\frac{l}{i}$
	larval μ^3	imaginal μ^3	
Männchen . .	11204	4160	2,69
Arbeiterinnen	4645	3477	1,26
Weibchen . .	10664	25561	0,42

ßenvergleich der larvalen mit den imaginalen Zellen der beiden Kasten und Geschlechter zeigt Tabelle 1.

Die Aktivitätsänderungen der Oenocyten der Ameisen sind eine Bestätigung der zyklischen Größenveränderungen, die von anderen Insekten durch die Arbeiten von KARAWAIEW (1898), KOSCHEVNIKOW (1900), PERÉZ (1903, 1911), RÖSSIG (1904), POYARKOFF (1910), GEE (1911), STENDELL (1912), KREMER (1917, 1920), HUFNAGEL (1918), HOSSELET (1925) und OCHSE (1944) bekannt wurden. Dagegen steht die Beobachtung über den Verbleib der larvalen Oenocyten bisher isoliert dar. Diese gelangen auf bisher noch unbekanntem Wege in das Lumen des

Mitteldarms, wo sie verdaut werden (Abb. 6). Eine Auflösung der larvalen Oenocyten in der Hämolyse konnte nicht beobachtet werden. Die unverdauten Chromatinreste werden später, wenigstens teilweise, mit dem Mekonium abgeschieden.

III. Cytologische Beobachtungen

1. Farbe und Färbung. Die Farbe der Oenocyten ist bei *F. polyctena* im lebenden Zustand wasserhell; nach Fixierung lassen sich die aktiven Zellen intensiv mit Eosin anfärben. Das Cytoplasma junger Oenocyten hat dagegen eine stärkere Affinität zu Hämalaun. Das vakuolisierte Cytoplasma besitzt im lebenden Zustand einen p_H-Wert von 5—5,5, während der Kern basischer reagiert. Mit Bromkresolpurpur (Farbumschlag zwischen p_H 5,2 bis 6,8) färbt er sich bereits intensiv blau, während das Cytoplasma gelblichgrün gefärbt wird. Im Phasenkontrastmikroskop zeigt es entweder eine körnige Struktur (Abb. 7, 8) oder es ist stark aufgelockert und enthält Sekrettröpfchen (Abb. 9, 10). Die Granulationen in den lebenden Zellen befinden sich in ständiger Bewegung; sie werden von der Brownschen Molekularbewegung angeregt.

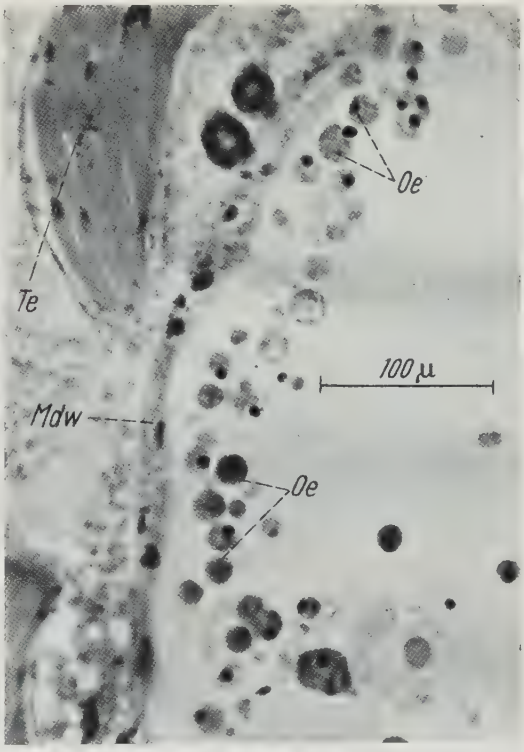


Abb. 6. Cytolyse der larvalen männlichen Oenocyten im Mitteldarm kurz vor beginnender Körperfärbung; Fixierung nach CARNOY, Färbung: Hämalaun-Eosin; Vergr. 230fach (Okk. 8×, Obj. 10/o. 25); *Mdw* Mitteldarmwand, *Oe* Oenocyten, *Te* Testes

2. Form und Größe. Die Form der Oenocyten ist bei frei flottierenden Zellen meistens rundlich oder elliptoid. Im Sekretionszustand findet man auch abgerundete polyedrische Formen, vereinzelt sogar unregelmäßig geformte Oenocyten. Junge Zellen haben im fixierten Zustand vielfach eine spindlige Gestalt.

Die Größe der Zellen ist (vgl. Abb. 5) während der einzelnen Entwicklungsstadien sehr verschieden; mit ihr schwankt auch die Kerngröße. Die imaginalen Oenocyten erreichen während der Puppenphase nur bei Weibchen höhere Durchschnittswerte als die larvalen. Ein Vergleich der Oenocytengröße in Tabelle 2 bei verschiedenen Geschlechtern und Kasten zeigt, daß diese Zellen im nicht aktiven Zustand etwa in der Mitte der Puppenphase bei den „diploiden" Weibchen etwa doppelt so groß sind wie bei den „haploiden" Männchen. Die Oenocyten der Arbeiterinnen, bei denen nach KRAMER (1959) ein Endomitoseschritt wegfällt, sind etwa so groß wie die der Männchen. Bezogen auf das Körpergewicht haben die Arbeiterinnen die größten Oenocyten. Sie zeigen demnach eine negative

Tabelle 2. *Größenvergleich der Oenocyten von Männchen, Weibchen und Arbeiterinnen von F. polyctena* FOERST.; *Mittelwerte von je 80 elliptoiden Zellen: Volumenberechnung nach* $^4/_3 \pi ab^2$

	Entwicklungsstadium: Augen voll pigmentiert				Entwicklungsstadium: kurz vor der Imginalhäutung			
	2a μ	2b μ	Volumen μ^3	Gewicht pro Tier mg	2a μ	2b μ	Volumen μ^3	Gewicht pro Tier mg
Männchen	15,6	13,4	1466	48,1	18,0	15,6	2292	40,1
Weibchen	21,0	17,0	3174	47,5	39,4	26,8	14810	39,4
Arbeiterinnen	14,8	13,0	1309	11,0	19,14	14,4	2077	8,5

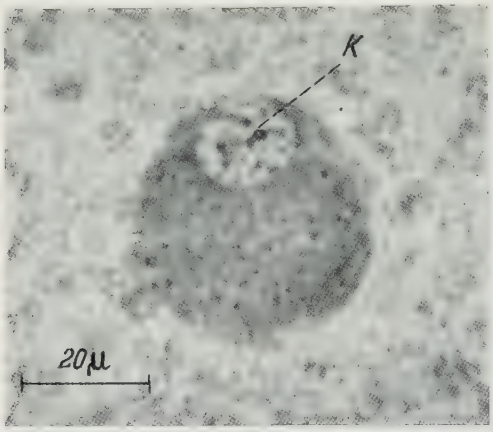


Abb. 7. Lebender weiblicher larvaler Oenocyt; Entwicklungsstadium: weiße Puppe mit beginnender Augenpigmentierung; nicht gefärbtes Präparat; Phasenkontrastaufnahme; Vergr. 850fach, (Okk. 8 ×, Obj. 40/o. 65), *K* Zellkern

Korrelation zum Körpergewicht. Kurz vor dem Schlüpfen ist das Verhältnis nur zwischen Männchen und Arbeiterinnen das gleiche geblieben. Die Weibchen weichen stark ab, obgleich die Gewichtsverhältnisse etwa die gleichen sind. Die Volumenvergrößerung der imaginalen weiblichen Oenocyten kurz vor der Imaginalhäutung ist auf eine intensivere Sekretionstätigkeit zurückzuführen und deshalb mit jener der entsprechenden Zellen von Männchen und Arbeiterinnen nicht vergleichbar.

Während die Ausbildung der Spermiocyten bei beginnender Körperpigmentierung nahezu abgeschlossen ist, setzt die Eientwicklung größtenteils jetzt erst ein. Offensichtlich spielen die Oenocyten hierbei eine Rolle, indem sie bereits auf dem späten Puppenstadium mit dem Umbau der verbliebenen und später benötigeten Reservestoffe beginnen.

Aber auch bei der Spermadifferenzierung scheinen die Oenocyten eine Rolle zu spielen. Nachstehende Tabelle 3 zeigt, daß die männlichen Oenocyten im Maximum eine stärkere Sekretbildung zeigen als diese im weiblichen Geschlecht.

Tabelle 3. *Größenvergleich inaktiver Oenocyten mit solchen größter Sekretspeicherung (in* μ^3*)*

	aktiv aus Tabelle 1	inaktiv aus Tabelle 2	Verhältnis
Männchen	11 204	1 466	7.6 : 1
Weibchen	10 664	3 174	3,4 : 1
Arbeiterin	4 645	1 309	3,5 : 1

Die inaktive Zelle vergrößert sich zu dieser Zeit bei Männchen etwa auf das 7,5 fache, während im weiblichen Geschlecht nur etwa das 3,5 fache Volumen erreicht wird. Diese Überlegungen setzen allerdings voraus, daß einerseits die Zellgröße der Sekretproduktion proportional ist und andererseits die Zahl der Oenocyten in allen drei Fällen etwa gleich ist. Bei der Vielzahl der vorhandenen Zellen (mehrere Hundert) ist dies nur schwer zu entscheiden. Auffällige Zahlenunterschiede konnten nicht festgestellt werden.

3. Sekretion. Wie breits aus Abb. 5 zu ersehen ist, ändern die Oenocyten während der Puppenphase ihren Aktivitätszustand. Bei einer näheren Betrachtung der Zellen lassen sich verschiedene Sekretionsphasen verfolgen. Neben wenigen inaktiven Zellen kann man auf gewissen Puppenstadien im allgemeinen sämtliche Funktionszustände beobachten. Die Kerne sind mehr oder weniger vakuolisiert und die Kernkörperchen sind deutlich sichtbar. Das Cytoplasma ist entweder stark granuliert (Abb. 7) oder es enthält zahlreiche, in ihrer Größe mitunter stark unterschiedliche Sekreteinschlüsse (Abb. 9, 10). Im fixierten Zustand zeigen die Oenocyten beider Generationen im Aktivitätszustand ein mehr oder weniger aufgelockertes Cytoplasma mit feinen Kanälen (Abb. 11). Ähnliche Strukturen wurden auch von Kreuscher (1922) bei *Dytiscus* und von Stendell (1912) bei *Ephestia* beobachtet. Häufig findet man auch große Vakuolen, die das sehr wahrscheinlich unter direkter Beteiligung des Kernes gebildete Sekret enthielten (Stendell 1912, Ochse 1946) und die sich manchmal um den Kern wie ausgestülpte Bläschen lagern. Sie lassen sich in der lebenden Zelle mit Eosin anfärben; im fixierten Zustand färben sich die Sekretvakuolen nicht an, weil das wasserlösliche Sekret im Laufe des Färbeprozesses verloren geht. Große Sekretvakuolen in imaginalen Oenocyten konnte bereits Janet (1907) bei den Ameisen *Lasius* und *Camponotus* während des Abbaues der Flugmuskulatur in der begatteten Königin beobachten.

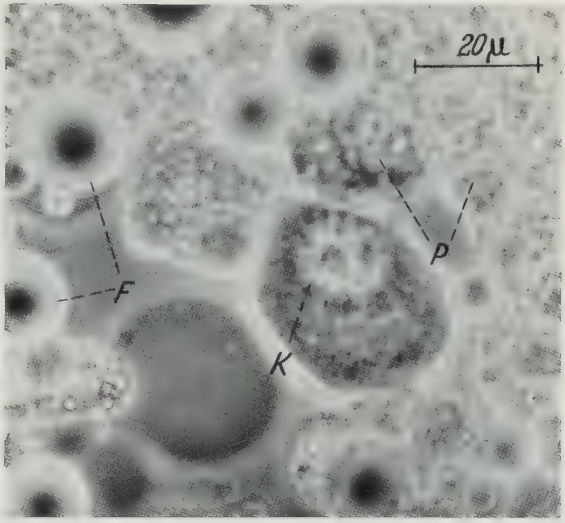


Abb. 8. Lebender männlicher larvaler Oenocyt; Entwicklungsstadium wie in Abb. 7; nicht gefärbtes Präparat; Phasenkontrastaufnahme; Vergr. 850fach (Okk. 8 ×, Obj. 40/o. 65); *K* Zellkern, *F* Fetttropfen, *P* Proteingranula

4. Zell- und Kernvermehrung. Eine noch offene Frage ist die Zellvermehrung der Oenocyten. Bewiesen ist lediglich, daß sich larvale und imaginale Oenocyten epidermal abgliedern können. Ob jedoch alle später vorhandenen Zellen auf diese Weise entstehen, ist ungeklärt. Jedoch konnte eine Zellteilung der Oenocyten nach Loslösung von der Epidermis bisher nie beobachtet werden.

Normalerweise enthält jeder Oenocyt bei *Formica* nur einen Zellkern mit zwei Nukleoli. Man findet aber auch Zellen mit zwei, ja sogar drei Kernen (Abb. 10). Andererseits kann ein Kern nur einen Nukleolus besitzen, aber vereinzelt findet man sogar auch drei Nukleoli in einem Zellkern. Ob überhaupt Nukleoli sichtbar sind, ist abhängig vom Aktivitätszusstand des Kernes. Mehrkernige Zellen haben ein größeres Volumen und, wie erwähnt, vielfach eine unregelmäßige Gestalt.

Die mit dem Alter zunehmende Mehrkernigkeit der Oenocyten wurde auf amitotische Kernteilungen zurückgeführt, bei denen die nachfolgende Zellteilung

ausblieb (STENDELL 1912, HUFNAGEL 1918). Eine amitotische Kernteilung ist auch insofern wahrscheinlich, weil bisher Mitosen niemals sicher beobachtet

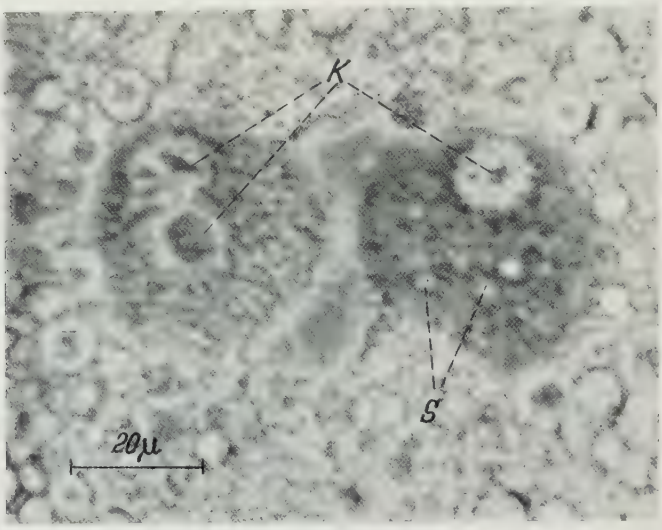


Abb. 9. Lebende, ein- und zweikernige, weibliche larvale Oenocyten mit Sekretkugeln; Entwicklungsstadium wie Abb. 7; Eosin-Vitalfärbung; Phasenkontrastaufnahme; Vergr. 850fach (Okk. 8 ×, Obj. 40/o. 65); *K* Kern, *S* Sekrettröpfchen

werden konnten und die Kerne offensichtlich nicht gleichwertig sind (Abb. 10). Dies berichten auch PERÉZ (1911) von *Polystes* (Hym.), KREUSCHER (1922) von

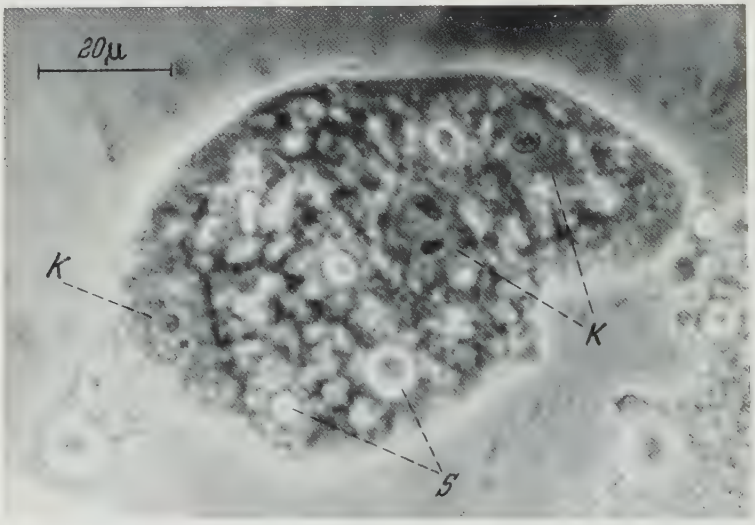


Abb. 10. Lebender, dreikerniger, männlicher larvaler Oenocyt mit Sekretkugeln; Entwicklungsstadium wie Abb. 7; Eosin-Vitalfärbung; Phasenkontrastaufnahme; Vergr. 850fach (Okk. 8 ×, Obj. 40/o. 65) *K* Kerne mit 1–3 Nukleoli, *S* Sekretkugeln

Dytiscus (Coleopt.) und HOSSELET (1925) von *Culex* (Dipt.). Knopsungsprozesse wurden dagegen bei Oenocytenkernen von *Hyponomeuta* (Lepidopt.) (HUFNAGEL

1918) und bei solchen von *Gerris* (Heteropt.) (Poisson 1924) beschrieben. Auch bei den Oenocyten von *F. polyctena* konnte in einem Falle eine „Knospung" beob-

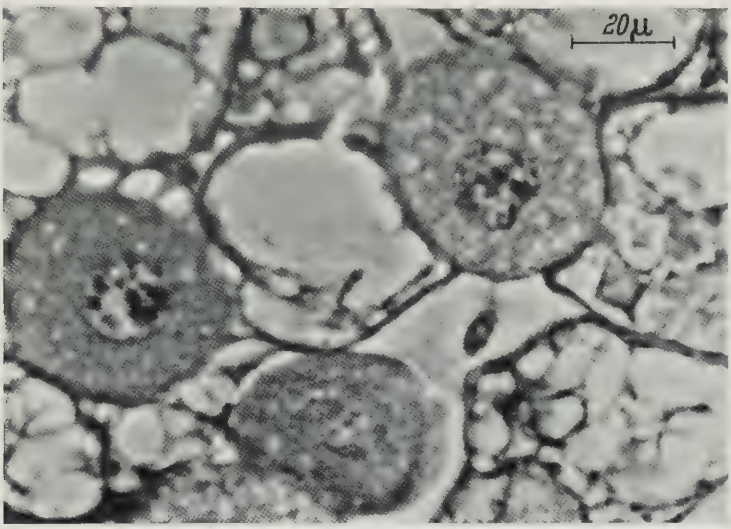


Abb. 11. Imaginale weibliche Oenocyten mit Trophocyten verankert nach Fixierung mit Carnoyschem Gemisch und Hämalaun-Eosin-Färbung Phasenkontrastaufnahme; Vergr. 650fach (Okk. 8×, Obj.; 40/o. 65)

achtet werden (Abb. 12). Die lebende Zelle beulte sich an der betreffenden Stelle aus, die Kernmembran riß auf und aus dem Innern des großen Mutterkernes wurde ein kleinerer Tochterkern ausgestoßen. Zur Zeit der Teilung war kein Nukleolus zu beobachten; der Kern zeigte eine sonst nicht übliche Struktur. Die Chromosomen lagen paarig zusammen, so daß der Kern ein doppelstreifiges Muster besaß. Dementsprechend handelt es sich bei *F. polyctena* nicht um einen einfachen Knospungsprozeß, sondern um ein Ausstoßen eines im Innern vorgebildeten Kernes. Diese Art von Kernteilung scheint bisher nicht beschrieben zu sein. Ob anschließend an solche Kernteilungen noch Zellteilungen stattfinden, konnte leider nicht entschieden werden, da die auf einem Objektträger sich befindende Zelle frühzeitig abstarb. Der kleinere Tochterkern scheint später auf die normale Größe anzuwachsen, da bei doppelkernigen Oenocyten im allgemeinen gleich große Kerne beobachtet wurden. Nach Kremer (1917)

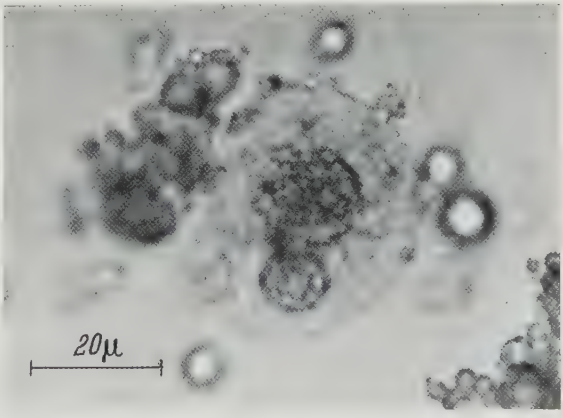


Abb. 12. Lebender männlicher larvaler Oenocyt in Kernteilung; Entwicklungsstadium: weiße Puppe mit fortgeschrittener Augenpigmentierung; Vitalfärbung mit Bromkresolpurpur; Chromatin ist blau gefärbt; normale lichtmikroskopische Aufnahme; Verg. 850fach (Okk. 8×, Obj. 40/o. 65); Näheres im Text

können mehrkernige Oenocyten bei Coleopteren auch durch Verschmelzung und Auflösung der Zellwände von zwei oder mehr einkernigen Zellen entstehen.

5. Speicherung von Reservestoffen. Mit Hilfe spezifischer histochemischer Methoden konnten in den Oenocyten Kohlenhydrate bzw. Glykogen und auch feinste Fetttröpfchen diffus verteilt nachgewiesen werden. Beide Reservestoffe sind in den Oenocyten in weitaus geringerer Menge vorhanden als in den Trophocyten, was gegen eine Speicherfunktion der Oenocyten spricht. Die Reservestoffe scheinen ihnen die zur Aufrechterhaltung ihres Stoffwechsels und vor allem die zur Sekretbildung notwendige Energie bzw. notwendigen Baustoffe zu liefern (vgl. auch PARDI 1938, 1939; POISSON 1924; WIGGLESWORTH 1942, 1948, 1949). Im Phasenkontrastmikroskop erkennt man die Glykogenkörnchen als kleine, in ständiger Bewegung sich befindende dunkle Partikelchen. Im fixierten Zustand färben sich feine Granulen im Cytoplasma mit Karmin nach BEST hellrot, mit Eosin färbt sich das Plasma deutlich rot und mit Bromphenolblau intensiv blau. In Gefrierschnitten läßt sich im letzteren Fall nach einer Gegenfärbung mit Sudan III das fein verteilte Fett erkennen.

Zur Funktion der Oenocyten

Die meisten Autoren vertreten die Ansicht, daß die Oenocyten im intermediären Stoffwechsel eine Rolle spielen. Sie sollen Sekrete in die Hämolymphe abgeben (GLASER 1912; HOLLANDE 1914; KREMER 1925, 1926; HUBER 1958). Diese Funktion soll in einem besonderen Zusammenhang zum Wachstum und vielleicht auch zur Reproduktion stehen. Es wird an eine Enzymbildung durch die Oenocyten gedacht.

Auch bei *Formica* ist eine Sekretbildung in den Oenocyten nachzuweisen und eine Sekretabgabe in die Hämolyse sehr wahrscheinlich. Die Sekretbildung der larvalen Oenocyten geht mit der Ausbildung der larvalen Organe einher. Man findet die Oenocyten besonders zahlreich an den Muskelbildungsstellen, wo ihnen sicherlich eine bestimmte Funktion zukommt, vielleicht als Fermentbildner (vgl. auch ANGLAS 1900; GLASER 1912; TIEGS 1922; DAY 1943; PFEIFFER-WEED 1945). Am Abbau der larvalen Organe scheinen sie nicht beteiligt zu sein. Überall dort, wo sich aktive larvale Oenocyten befinden, beginnt die Cytolyse der Trophocyten. Die Wirkung des Oenocytensekrets scheint nach diesen Beobachtungen eine mehr lokale zu sein. Damit wird auch die verschiedene Wanderung der Oenocyten während der Puppenphase verständlich.

Ein direkter Zusammenhang zwischen Oenocytenfunktion und Häutungsvorgängen konnte bei *Formica*, ähnlich wie HUBER (1958) von *Sialis* berichtet, entgegen den Vermutungen von KOLLER (1929) und YOKOYAMA (1936) nicht festgestellt werden. Das Sekretionsmaximum der weiblichen Oenocyten liegt erst nach der Puppenhäutung (Abb. 5), während man bei Männchen ohne Vergleich eine Beziehung vermuten könnte. Auf Grund ihres verschiedenen Verhaltens ist es jedoch sehr unwahrscheinlich, daß Oenocyten Hormone bilden. So weist auch die sehr unterschiedliche Größe der imaginalen Oenocyten nicht auf direkte Beziehungen zur Imaginalhäutung hin.

Andererseits betrachten WIGGLESWORTH (1942, 1959), KAISER (1950), WOLFE (1954), DENELL und MALEK (1955) die Oenocyten als Lipoproteid-Bildner und machen sie für die Bildung der in die Cuticulin-Schicht eingelagerten Lipo-

proteide verantwortlich. Auf die Bildung von Lipoproteiden durch die larvalen Oenocyten von *Formica* deuten gewisse Beobachtungen hin, z.B. die hohe Fettreduktion zur Zeit der maximalen Oenocyten-Aktivität, über die an anderer Stelle näher berichtet werden soll. Für die Bildung von kutikulären Lipoproteiden konnten jedoch eher negative als positive Anhaltspunkte gewonnen werden, denn zur Zeit der Cuticula-Bildung sind die Oenocyten am wenigsten aktiv. Auch ihre Wanderung von der Peripherie ins Körperlumen, wo dann die höchste Aktivität erreicht wird, spricht eher dagegen als dafür.

Den imaginalen Oenocyten scheint die Aufgabe zuzukommen, die Hämolymphe von zurückgebliebenen Reservestoffen zu befreien und diese zunächst in das Speichergewebe einzubauen, später wiederum zu mobilisieren, während die larvalen Oenocyten keine Beziehungen zur Einlagerung der Reservestoffe auf dem Larvenstadium erkennen ließen. Weiterhin scheint den imaginalen Oenocyten eine Bedeutung bei der Differenzierung der Ovarien bzw. Eibildung zuzukommen, wie aus Abb. 5 und Tabelle 2 entnommen werden kann. Ihre Funktion wird jedoch nur eine mittelbare sein, indem sie dem Weibchen-Körper die notwendigen Baustoffe liefern (vgl. auch Kremer 1917). Eine Hormonbildung oder Hormonspeicherung scheint auch hier sehr zweifelhaft. Eher ist diesen Zellen eine *Funktion im intermediären Stoffwechsel* zuzuschreiben. So zeigt die Inaktivierung der Oenocyten der Männchen kurz vor der Imaginalhäutung bereits das baldige Absterben dieser nach der Häutung an (vgl. dazu Schmidt 1962). Bei Weibchen und Arbeiterinnen bleiben die Oenocyten nach der Imaginalhäutung weiterhin aktiv.

Die Sekretbildung und damit die Funktion der imaginalen Oenocyten ist nach Thomsen (1956) bei *Calliphora* (Dipt.) an eine eiweißhaltige Nahrung gebunden. Die imaginalen Oenocyten nehmen nur bei Fleischnahrung an Größe zu. Dies deutet darauf hin, daß proteinhaltige Sekrete gebildet werden.

Die Schlußfolgerung von Koschevnikow (1900) und Berlese (1899, 1902), den Oenocyten komme Exkretionsfunktion zu, dürfte nicht vertretbar sein. Eine Akkumulation in die Hämolymphe injizierter Farbstoffe in den Oenocyten ist kein Beweis für eine exkretorische Funktion dieser Zellen; das gleiche gilt für die in den Zellen gefundene Harnsäure. Zweifelsohne haben die Oenocyten, wie auch Huber (1958) zeigte, wenigstens zeitweise einen hohen Stoffwechsel, der eine Anreicherung von körperfremden Stoffen und Harnsäure mit sich bringen kann, wenn den Zellen die notwendige Selektivität oder schnelle Abscheidung in die Hämolymphe fehlt. Auch die Hypothese von Berlese (1899), daß die Oenocyten während der Metamorphose die Aufgabe der nun funktionslosen Malpighi-Gefäße übernehmen sollen, erklärt nicht das Sekretionsmaximum der imaginalen Oenocyten von *Formica* kurz vor der Imaginalhäutung. Wie an anderer Stelle gezeigt werden soll, kommt diese exkretorische Funktion während der Metamorphose den sog. Uratzellen zu.

Der wesentlichste Unterschied zwischen larvalen und imaginalen Oenocyten besteht wohl neben ihrer verschiedenen Verteilung im Körper darin, daß die larvalen Oenocyten bei der Mobilisierung der larvalen Reservestoffe und beim Aufbau der imaginalen Organe eine Rolle spielen, während die imaginalen Oenocyten für die Klärung der Hämolymphe sowie für die Eibildung verantwortlich zu sein scheinen. Für den allgemeinen Betriebsstoffwechsel sind sie anscheinend

entbehrlich, da die Männchen von *Formica* auch mit inaktiven Oenocyten normalerweise noch 1—2 Wochen nach der Imaginalhäutung leben können, wenn ihnen ausreichende Nahrung geboten wird. Beiden Generationen von Oenocyten scheint die Aufgabe zuzufallen, *Fermente für den Baustoffwechsel* zu liefern.

Zur hormonalen Beeinflussung der Oenocyten

Noch weitgehend umstritten ist die Frage, wieweit die Oenocyten in ihrer Funktion durch Hormone beeinflußt werden. Bei *Formica* fallen die Aktivitätsmaxima der Oenocyten während der Puppenphase zusammen mit der stärksten Sekretionstätigkeit der Corpora allata (SCHMIDT 1961). Ob das Hormon der Corpora allata bei *Formica* eine direkte Wirkung auf die Oenocyten ausübt, ist nicht erwiesen. HUBER (1958) konnte jedoch bei *Sialis* durch Schnürversuche und Oenocytenkoagulation zeigen, daß die Corpora allata auf die Oenocytensekretion fördernd wirken, letztere auf erstere dagegen hemmend. Der Einfluß der Corpora allata auf die Oenocyten läßt sich auch aus den Versuchen von DAY (1943) und VOGT (1947) erkennen, wonach bei Dipteren nach Exstirpation der Ringdrüse bzw. des den Corpora allata entsprechenden Teils eine Pyknotisierung der Oenocytenkerne und damit eine starke Einschränkung der Zellfunktion erfolgt. Bei *Formica* besteht bei beiden Kasten und Geschlechtern auch eine deutliche Parallelität zwischen der Aktivität der Corpora allata und der Sekretion der imaginalen Oenocyten (SCHMIDT 1961).

Zusammenfassung

Mit histologischen und histochemischen Methoden wurden die Oenocyten von Männchen, Weibchen und Arbeiterinnen während der Puppenphase von *Formica polyctena* FOERST. untersucht, um Einblicke in ihre Funktion während der Metamorphose zu erhalten.

Bei *Formica* lassen sich zwei Generationen von Oenocyten, larvale und imaginale, unterscheiden, die lateral von der Hypodermis des Abdomens bzw. Gasters abgegliedert werden. Während der ganzen larvalen Phase bleiben sie mit der Hypodermis in Verbindung. Zu Beginn der inneren Metamorphose verteilen sie sich auf dem Lymphwege über den ganzen Körper und finden sich konzentriert an den Stellen der Organbildung. Vor beginnender Körperpigmentierung gelangen die larvalen Oenocyten ins Mitteldarmlumen und werden dort verdaut, während gleichzeitig die imaginalen Oenocyten mit den Trophocyten sich verankern, was mit einer Klärung der Hämolymphe einhergeht.

Die Oenocyten besitzen eine sehr verschiedene Größe, die stark vom Sekretionszustand abhängig ist. Die larvalen Oenocyten erreichen ein Aktivitätsmaximum kurz vor bzw. nach der Puppenhäutung, die imaginalen kurz vor der Imaginalhäutung. In der Größe und Aktivität der Oenocyten bestehen während der Metamorphose Unterschiede zwischen beiden Kasten und Geschlechtern.

In den Oenocyten konnten sowohl im lebenden Zustand als auch nach Fixierung Sekretvakuolen festgestellt werden.

Die Farbe der granulierten Oenocyten ist wasserhell; ihr Cytoplasma besitzt einen p_H-Wert von etwa 5—5,5 im aktiven Zustand. Ihre Form ist kugelig oder elliptoid. Die Zahl der Zellkerne schwankt zwischen 1—3, wobei einkernige Zellen stark überwiegen. Die Kernvermehrung scheint amitotisch nach einem

besonderen Typus zu erfolgen; sie konnte in einem Falle beobachtet werden. Mitosen und Zellteilungen waren nicht feststellbar. Die Kerne enthalten meistens zwei Nukleoli, oft nur einen, aber manchmal auch drei.

In den Oenocyten konnten Glykogen und Fett nachgewiesen werden; die Oenocyten können deshalb jedoch nicht als Speicherzellen betrachtet werden.

Während der Metamorphose scheinen die Oenocyten eine wesentliche Rolle als Fermentbildner zu spielen; sie sind am Aufbau der imaginalen Organe maßgeblich beteiligt. Den imaginalen Oenocyten kommt neben dem Umbau der Trophocyten offensichtlich beim weiblichen Geschlecht eine Funktion bei der Eibildung zu. Für hormonale und exkretorische Funktionen ergaben sich keine Anhaltspunkte.

Die hormonale Steuerung der Oenocyten scheint durch die Corpora allata zu erfolgen.

Literatur

Albro, H. T.: A cytological study of the changes in the oenocytes of *Gallerucella nymphaea* L. during the larval and pupal periods of developement. J. Morph. Physiol. **50**, 527—568 (1930).

Anglas, J.: Observations sur les métamorphoses internes de la Guepe et de l'Abeille. Bull. sci. France Belg. **34**, 1—111, 363—473 (1900/01).

Berlese, A.: Observationes su fenomeni che avvengono durante la ninfosi degli insetti metabolici. Riv. Pat. veget. **8**, 1—155 (1899); **9**, 177—344 (1902).

Day, M. F.: The function of the corpus allatum in muscoid diptera. Biol. Bull. **84**, 127—140 (1943).

Denell, R., and S. R. A. Malek: The cuticle of the cockroach *Periplaneta americana*. I. The appearance and the histological structure of the dorsal surface of the abdomen. Proc. roy. Soc. B **143**, 126—135 (1955). — II. The epicuticle. Proc. roy. Soc. B **143**, 239—256 (1955). — III. The hardening of the cuticle: impregnation preparatory to phenolic tanning. Proc. roy. Soc. B **143**, 414—426 (1955). — IV. The hardening of the cuticle: phenolic tanning. Proc. roy. Soc. B **143**, 427—434 (1955).

Fabre, M.: Étude sur l'instinct les metamorphoses des Sphégiens. Ann. Sci. natur, III. s. Zool. **6** (1856).

Gee, W. P.: The oenocytes of *Platyphylax designatus* Walker. Biol. Bull. **21**, 222—234 (1911).

Glaser, R. W.: Contribution to our knowledge of the function of oenocytes of insects. Biol. Bull. **23**, 213—224 (1912).

Glöckner, W. E.: Beiträge zur Postembryonalentwicklung von *Solenopsis fugax* Latr. (*Hym. Form.*) nebst einigen histochemischen Untersuchungen. Diss. Inst. für Angewandte Zoologie der Univ. Würzburg 1954.

Hollande, A. C.: Les cévodecytes ou oenocytes des insectes au point de vue biochimique. Arch. Anat. micr. Morph. exp. **16**, 1—64 (1914).

Hosselet, C.: Les oenocytes des *Culex annulatus*. C. R. Acad. Sci. (Paris) **180**, 399—401 (1925).

Huber, M.: Histologische und experimentelle Untersuchungen über die Oenocyten der Larve von *Sialis lutaria* L. Z. Zellforsch. **49**, 661—697 (1958).

Hufnagel, A.: Recherches histologiques sur la métamorphose d'un lépidoptère (*Hyponomeuta padella* L.). Arch. Zool. exp. **57**, 27—202 (1918).

Janet, Ch.: Anatomié du corselet et histolyse des muscles vibrateurs apres le vol nuptial, chez la reine de la fourmi (*L. niger*). Limoges 1907; 149 pp.

Kaiser, P.: Zur Kenntnis der Oenocyten. Histologische Untersuchungen am Großen Kohlweißling. Zool. Anz. **145**, 364—372 (1950).

Karaweiew, W.: Die nachembryonale Entwicklung von *Lasius flavus*. Z. wiss. Zool. **64**, 385—478 (1898).

Koch, J.: Die Oenocyten der Insekten, mit besonderer Berücksichtigung ihres Verhaltens in der Metamorphose von *Drosophila melanogaster* Meig. Dipl.-Arbeit, Zool. Inst. Zürich 1944. Zit. nach Huber 1958.

KOLLER, G.: Die innere Sekretion bei wirbellosen Tieren. Biol. Rev. **4**, 269—306 (1929).
KOSCHEVNIKOW, G.: Über den Fettkörper und die Oenocyten der Honigbiene. Zool. Anz. **23**, 337—353 (1900).
KRAMER, U.: Die Kerngrößenverhältnisse in der Larvenentwicklung verschiedener Kasten bei Formiciden. Z. Morph. u. Ökol. Tiere **48**, 169—208 (1959).
KREMER, J.: Beiträge zur Histologie der Coleopteren mit besonderer Berücksichtigung des Flügeldeckengewebes und der auftretenden Farbstoffe. Zool. Jb., Abt. Anat. und Ontol. **40**, 105—154 (1917).
– Die Flügeldecken der Coleopteren. Eine kritische Studie. Zool. Jb., Abt. Anat. u. Ontol. **41**, 175—272 (1920).
— Die Oenocyten der Coleopteren. Z. mikr.-anat. Forsch. **2**, 536—581 (1925).
— Die Metamorphose und ihre Bedeutung für die Zellforschung. I. Insecta. Z. mikr.-anat. Forsch. **4**, 290—345 (1926).
KREUSCHER, A.: Die Fettkörper und die Oenocyten von *Dytiscus marginalis*. Z. wiss. Zool. **119**, 247—284 (1922).
MAZIA, D., PH. A. BREWER and M. ALFERT: The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromphenol blue. Biol. Bull. **104**, 57—67 (1953).
MURRAY, F. V., and O. W. TIEGS: The metamorphosis of *Calandra oryzae*. Quart. J. micr. Sci. **77**, 405—495 (1935).
OCHSE, W.: Experimentelle und histologische Beiträge zur inneren Metamorphose von *Sialis lutaria* L. Rev. suisse Zool. **51**, 1—82 (1944).
— Untersuchungen über die Oenocyten von *Sialis luteria* L. Rev. suisse Zool. **53**, 39—72 (1946).
OERTEL, E.: Metamorphosis in the honey bee. J. Morph. **50**, 295—340 (1930).
PANTEL, J.: Essai Monographique sur une larve parasite du groupe des Tachinaires. Cellule **15**, 7—290 (1898).
PARDI, L.: Glicogeno degli enociti e suo significato. Monit. zool. ital. **49**, 108—115 (1938).
— Osservazioni di istofisiologia su *Melasoma populi* L. (*Col. Chrysom.*). Enociti e mute. Monit. zool. ital. **50**, 88—93 (1939).
PERÉZ, CH.: Sur les oenocytes de la Fourmi rousse (*Formica rufa* L.). Bull. Soc. Entom. France **19**, 351—353 (1901).
— Contribution a l'étude des metamorphoses des insectes. Bull. sci. France Belg. **37**, 195—427 (1903).
— Recherches histologiques sur la métamorphose de muscides (*Calliphora erythrocephala* MEIG.). Arch. Zool. exp. gén. **4**, 1—274 (1910).
— Observations sur l'histolyse et l'histogenese dans la métamorphose des Vespides (*Polistes gallica* L.). Mem. Acad. roy. Belg. Cl. Sci. **3**, 1—103 (1911).
PFEIFFER-WEED, J.: Effect of the corpora allata on the metabolism of adult female grasshoppers. J. exp. Zool. **99**, 183—233 (1945).
POISSON, R.: Contribution a l'étude des Hémiptères aquatiques. Bull. Biol. sci. France Belg. **58**, 49—202 (1924).
POYARKOFF, E.: Recherches histologiques sur la métamorphose d'un coleoptére (la Galeruque de l'orme). Arch. Anat. micr. Morph. exp. **12**, 333—474 (1910).
RISLER, H.: Die somatische Polyploidie in der Entwicklung der Honigbiene (*Apis mellificia* L.) und die Wiederherstellung der Diploidie bei den Drohnen. Z. Zellforsch. **41**, 1—78 (1954).
RÖSSIG, H.: Von welchen Organen der Gallwespe geht der Reiz zur Bildung der Pflanzengalle aus? Zool. Jb., Abt. System. Ökol. u. Gegr. **20**, 19—86 (1904).
ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. München: Leipniz 1948.
SCHMIDT, G. H.: Zur Methodik der histologischen Fettuntersuchung, angewandt bei Insekten. Naturwissenschaften **46**, 264 (1959).
— Histophysiologische Untersuchungen zur Bedeutung der Oenocyten während der Metamorphose der Roten Waldameise *Formica polyctena* FOERST. (*Hym. Form.*). Verh. Dtsch. Zool. Ges. in Saarbrücken 1961; Zool. Anz. Suppl. **25** (1962, im Druck).
— Histologische Untersuchungen zur Funktion der Corpora allata während der Metamorphose von *Formica polyctena* FOERST. (*Ins. Hym. Form.*). Verh. IV. Int. Kongr. Int, Union z. Studium der soz. Insekten. Pavia 1961, im Druck in „Symposia Genetica".
SCHMIEDER, R. G.: Observations on the fat body in Hymenoptera. J. Morph. **45**, 121—184 (1928).

Schnelle, H.: Über den feineren Bau des Fettkörpers der Honigbiene. Zool. Anz. **57**, 172—179 (1923).

Stendell, W.: Beitrag zur Kenntnis der Oenocyten von *Ephestia kühniella* Z. Z. wiss. Zool. **102**, 136—168 (1912).

Thomsen, E.: Observations on the oenocytes of the adult *Calliphora erythrocephala* Meig. Bertil Hanström Zool. Papers 1956; p. 298—306.

Tiegs, O. W.: Researches on the insect metamorphosis. I. On the structure and post-embryonic development of a chalcid wasp, *Nasonia*. II. On the physiology and interpretation of the insect metamorphosis. Trans. roy. Soc. Sci. Aust. **46**, 319—527 (1922).

Vogt, M.: Fettkörper und Oenocyten der *Drosophila* nach Exstirpation der adulten Ringdrüse. Z. Zellforsch. **34**, 160—164 (1947).

Weissenberg, R.: Oenocyten von *Torymus nigricornis* Boh. mit besonderer Berücksichtigung der Metamorphose. Zool. Jb., Abt. Anat. u. Ontog. **23**, 231—268 (1907).

Wheeler, W. M.: Concerning the blood tissue of the insecta. Psyche (Stuttgart) **6**, 216—220, 233—236, 253—258 (1892).

Wielowiejski, H. R.: Über das Blutgewebe der Insekten. Eine vorläufige Mitteilung. Z. wiss. Zool. **43**, 512—536 (1886).

Wigglesworth, V. B.: The physiology of the cuticle and of ecdysis in *Rhodnius prolixus* with special reference to the function of oenocytes and dermal glands. Quart. J. micr. Sci. **76**, 269—318 (1933).

— The storage of protein, fat, glycogen and uric acid in the fat body and other tissues of mosquito larvae. J. exp. Biol. **19**, 56—77 (1942).

— The epicuticle in an insect, *Rhodnius prolixus* (*Hemipt.*). Proc. roy. Soc. B **134**, 169—181 (1947).

— The structure and the deposition of the cuticle in the adult mealworm, *Tenebrio molitor*. Quart. J. micr. Sci. **89**, 197—217 (1948).

— The utilisation of reserve substances in *Drosophila* during flight. J. exp. Biol. **26**, 150—163 (1949).

— Physiologie der Insekten. Basel u. Stuttgart: Birkhäuser. Dtsch. Übersetzung v. M. Lüscher **1959**, 823 S.

Willers, W.: Celluläre Vorgänge bei der Häutung der Insekten. Z. wiss. Zool. **116**, 43—74 (1916).

Wolfe, L. S.: The deposition of the 3rd instar larval cuticle of *Caliphora erythrocephala*. Quart. J. micr. Sci. **95**, 49—66 (1954).

Yokoyama, T.: Histological observations on a nonmoulting strain of silkworm. Proc. roy. Entom. Soc. Lond. A **11**, 35—44 (1936).

Dr. G. H. Schmidt,
Institut für Angewandte Zoologie der Universität Würzburg, Röntgenring 10

Zeitschrift für Zellforschung 55, 724—762 (1961)

Elektronenmikroskopische Abteilung der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes Homburg

STRUKTUR UND FUNKTION DER GLATTEN MUSKULATUR

II. LICHT- UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE BEFUNDE AN HOHLORGANEN VON RATTE, MEERSCHWEINCHEN UND MENSCH*

Von

HEDI GANSLER**

Mit 28 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. August 1961)

Inhalt

Seite

A. Einleitung: Literaturübersicht und Fragestellung 724
B. Material und Methode 728
C. Befunde 729
I. Lichtmikroskopie 729
1. Lebendbeobachtung S. 729. — 2. Befunde an Paraffinschnitten S. 730. — 3. Phasenkontrastmikroskopische Befunde S. 733.
a) Darm S. 733. — b) Uterus S. 734.
II. Elektronenmikroskopie 734
1. Darm S. 734. — 2. Uterus S. 740. — 3. Gefäße S. 741. — 4. Feinstruktur der Muskelzelle S. 741. — a) Myoplasma S. 741. — b) Membrankomplex S. 748. — c) Zellkern S. 750. — d) Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum S. 750. — 5. Befunde zur Innervation S. 751. — 6. Beeinflussung der Ultrastruktur durch präparative Faktoren S. 752. — a) Glycerinextraktion und Nachkontrastierung S. 752. — b) Schnittbedingte Faktoren S. 755. — c) Fixierungsbedingte Strukturänderungen S. 755.
D. Besprechung der Befunde 755
I. Die Einzelzelle 755
II. Die Muskelbündel 759
Zusammenfassung 760
Literatur 761

A. Einleitung

Die *morphologischen Arbeiten* über glatte Muskulatur befassen sich entweder mit der Architektonik des Gesamtorgans oder mit der Histo- und Cytologie von Schnittpräparaten. Die Kenntnis der Architektonik glattmuskulärer Hohlorgane geht vor allem auf GOERTTLER (1931 und 1932) zurück. Er hat besonderen Wert auf eine funktionelle Betrachtung des Zusammenspiels von longitudinal und zirkulär verlaufenden Muskelschichten gelegt und betrachtet das bindegewebige, unelastische Scherengitter des Darmrohres als eigentlichen Funktionsträger für Enger- und Weiterstellung von Hohlorganen. Die Muskelbündel der Ringmuskulatur sollen in enger gestellten Wandabschnitten annähernd radiär, in weiter gestellten Abschnitten tangential zur Längsachse des Darmrohres verlaufen. Die Verschiebung soll dadurch zustande kommen, daß zwei sich überkreuzende Systeme kollagener Fasern von der Serosa bis zur Schleimhaut ein dreidimensionales, unelastisches Skelett (Scherengitter) bilden. Am Dünndarm

* Durchgeführt mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.
** MARLIS BECKER und EVA-MARIA FINZE danke ich für wertvolle technische Hilfe.

soll eine polare Anordnung dieser Fasern von außen oben nach innen unten die Ausbreitung einer Kontraktionswelle nur in aboraler Richtung ermöglichen, während am Dickdarm ein apolares Scherengitter nachgewiesen wurde. Ein entsprechendes Strukturschema hat GOERTTLER (1932) auch für den Uterus entworfen, das den speziellen Aufgaben dieses Organs angepaßt ist. Eine wesentliche Voraussetzung für die Funktion glatter Muskeln sieht GOERTTLER in der Unversehrtheit der ganzen Muskelwand, vor allem von Serosa und Submucosa, an denen das Scherengitter befestigt ist.

Am Aufbau der Gefäßmuskulatur großkalibriger Arterien sind nach BENNINGHOFF (1927) elastische „Sehnen" maßgebend beteiligt; die zwischengeschalteten Muskelzellen sollen einen regulierenden Einfluß haben. Beide Autoren gehen auf die mit Kontraktion und Erschlaffung verbundenen *Zell*veränderungen nicht ein.

Die zweite Gruppe von morphologischen Arbeiten umfaßt die lichtmikroskopische Histo- und Cytologie von glatten Muskelzellen. KÖLLIKER (1849) hat als Erster die Existenz von Muskel*zellen* nachgewiesen, im Gegensatz zu ROUGET (1863; zit. nach M. HEIDENHAIN 1900), der ein vielkerniges, syncytiales Gefüge ohne Zellgrenzen angenommen hatte. Uneinheitlich wird die Frage beantwortet, ob diese Muskelzellen ein partielles Syncytium bilden, d. h. durch Zellbrücken oder seitliche Zellfortsätze miteinander in Verbindung stehen. Dieser Annahme liegen Beobachtungen zugrunde, wonach die glatte Muskulatur vor allem auf Querschnitten große Ähnlichkeit mit dem Rete Malpighi der Haut hat. BARFURTH (1891) hat diese „Stachelzellen" an Därmen — unmittelbar nach Fütterung der Tiere — beobachtet. Da die Stachelzellen auf Querschnitten besser zu sehen sein sollen als auf Längsschnitten, nahm er an, daß es sich um feine, parallel zur Längsachse der Muskelzellen verlaufende leistenartige Vorsprünge handele. BOHEMANN (1895) widerlegte diese Annahme, indem er auch an Längsschnitten sehr feine stachelähnliche Fortsätze nachwies, die er im Sinne von Zellbrücken deutete. Auf Grund dieser Befunde nach Tusche-Injektion nahm er gleichzeitig Stellung gegen die Ansicht, daß die Muskelzellen durch eine Art Kittsubstanz fest miteinander verbunden seien. Vielmehr soll sich zwischen den durch Zellbrücken verbundenen Muskelzellen ein Netz lymphatischer Räume befinden. Nach M. HEIDENHAIN (1900) können Stachelzellen auch da vorkommen, wo überhaupt keine Nachbarzellen vorhanden sind. Diesen Befund deutet der Autor als „Pseudo-Interzellularbrücken", für deren Entstehung er artefizielle Schrumpfungsprozesse annimmt. Außerdem betont HEIDENHAIN, daß die Interzellularbrücken oft und leicht mit den bindegewebigen „Membranellen" verwechselt werden, die die Muskelzellen strumpfartig umhüllen und ebenfalls durch Querlamellen untereinander in Verbindung stehen sollen. Interessant ist in diesem Zusammenhang HEIDENHAINs Beobachtung, daß sich das Bindegewebe je nach der Weite der Interstitien verschieden verhält. Er schreibt [Erg. Anat. **10**, 157 (1901)]: „a) Sind die Interstitien auf ein Minimum beschränkt, so scheinen die Längsmembranellen den Nachbarzellen gemeinsam zu sein, oder es hat dies wenigstens streckenweise statt. b) Werden die Interstitien ein wenig breiter, so erscheinen auch die Längsmembranellen gespalten und in dem Zwischenraum zwischen ihnen kommen sofort die Quermembranellen zum Vorschein. c) Die unter a und b genannten Zustände wechseln jedenfalls gewöhnlicherweise an

derselben Muskelhaut miteinander ab. Stellt man sich vor, daß die bindegewebigen Längshülsen der glatten Muskelzellen an vielen Orten streckenweise miteinander verschmolzen sind, ferner daß massenhafte Querdurchzüge die Längshülsen verbinden, so kommt man im ganzen zu einer Art bindegewebigem Wabensystem." Außer diesen interstitiellen Häuten beschreibt HEIDENHAIN noch die sog. Grenzfibrillen, die er als Differenzierung der Grenzschicht (Sarkolemm) auffaßt.

HÄGGQVIST (1932, 1956) betrachtet die glatte Muskulatur als eine zusammenhängende Protoplasmamasse mit verschiedenen Zonen: die innere Zone (Endoplasma) wird vom Zellkern und granulärem Cytoplasma gebildet, die mittlere Zone (Mesoplasma) besteht aus Myofibrillen und interfibrillärem Sarkoplasma und die äußere Zone (Exoplasma) umfaßt Kollagen, elastische und präkollagene Einheiten.

Über die während der Kontraktion sich abspielenden morphologischen Veränderungen der Muskelzellen gibt es eine Reihe einander widersprechender Befunde und Theorien. Von vielen Autoren wird angenommen, daß die kontrahierten Muskelzellen kürzer und dicker seien, während andere über eine unterschiedliche Farbaffinität der Muskelzellen berichten. So beobachtete MCGILL (1909) vorwiegend dunkle Muskelzellen in kontrahierten Geweben. Auch HENNEBERG (1900) fand helle und dunkle Muskelzellen, hält jedoch die hellen für die kontrahierten, da diese kürzer und dicker seien als die dunklen. Eine funktionelle Deutung heller und dunkler Muskelzellen wird dadurch erschwert, daß beide Formen stets nebeneinander vorkommen. GRÜTZNER (1904) hält Formveränderungen der Muskelzellen funktionell für bedeutungslos. Er nimmt an, daß Verkürzung und Erschlaffung bzw. Verlängerung glattmuskulärer Organe vor allem auf einer kulissenartigen Verschiebung der Zellen gegeneinander beruhe, da die Ringmuskulatur am gefüllten Froschmagen nur aus wenigen Zell-Lagen bestehe, am leeren Froschmagen dagegen vielschichtig sei. Auf Grund dieser Befunde lehnt GRÜTZNER die Existenz von Interzellularbrücken ab, die ein solches Gegeneinandergleiten weitgehend einschränken würden. Der Befund GRÜTZNERs läßt sich jedoch mühelos mit dem von GOERTTLER beschriebenen Verstellmechanismus der einzelnen Muskelbündel erklären. Unter Zugrundelegung dieses Schemas ergibt sich von selbst, daß radiär gestellte Bündel auf Querschnitten stets vielschichtig erscheinen, tangential verlaufende Bündel dagegen eine dünnwandigere Ringmuskulatur bewirken. Nach ROSKIN (1936) soll die Verkürzung der Muskelzellen auf einer schraubigen Verdrehung sowohl von Zellen als auch von Zellkernen beruhen. E. FISCHER (1944) führt solche Schraubenformen auf passive Stauchungen zurück, die durch aktive Kontraktion benachbarter „Myome" bewirkt würden. Formveränderungen der Zellkerne kontrahierter Zellen hat HEIDENHAIN (1900) beobachtet; er nahm an, daß die kontrahierten Massen der Zelle auf die Kernpole einen Druck ausüben, wodurch in extremen Fällen sogar eine Knickung des Kerns erfolgen könne. Die an Schnitten erhobenen Befunde mehrkerniger Muskelzellen sollen darauf zurückzuführen sein, daß solche Zellen nicht im Profil, sondern flach angeschnitten seien. MEIGS (1912) beschreibt eine *Volumabnahme* der Muskelzellen des Froschmagens während der Kontraktion. Nach MEIGS beruht diese auf einem Auspressen von Zellsaft in den Extrazellularraum. Auf Unterschiede der Farbaffinität ist MEIGS in seinen Untersuchungen nicht eingegangen. Erst in neuerer Zeit finden sich wieder Hinweise auf die

Entquellungstheorie von Meigs (Greven 1951, Bailey 1954). Untersuchungen von Spanner (1939) und Staubesand (1949) befassen sich mit der Quellfähigkeit epitheloid modifizierter Gefäßmuskelzellen. Hirsch (1955) glaubt zeigen zu können, daß die funktionelle Leistung aller Gefäße in Quellung und Entquellung bestehe. Auch für den Skelettmuskel wird die Frage einer Volumabnahme („Konstriktion") während der Kontraktion von Dubuisson (1954) erörtert.

Der Einfluß der Ovarialhormone auf die Uterus-Muskulatur wurde von Stieve (1929) und Froböse (1935) untersucht; in erster Linie fanden die Veränderungen während der Gravidität Beachtung. Neben einer Hypertrophie der Muskelzellen glauben die Autoren eine Neubildung von Muskelzellen aus bindegewebigen Elementen nachweisen zu können. (Eine genetische Verwandtschaft von Bindegewebs- und Muskelzellen wird auch von Häggqvist angenommen.) Stieve beschreibt den Zellverband ebenfalls als anastomosierendes dreidimensionales Netz. Über die Veränderungen von Uteri unter Follikelhormonwirkung haben wir früher berichtet (Gansler 1954, 1956).

Die Frage der Existenz von fibrillären Differenzierungen in den Muskelzellen wird sehr unterschiedlich beantwortet. Auch hierzu finden wir eine ausführliche Stellungnahme bei Heidenhain. Nach seinen Befunden ist eine Fibrillierung gerade in gut fixierten Geweben nicht sehr deutlich zu sehen, wohl aber nach Anwendung von Fixierungsmitteln, die eine stärkere Schrumpfung bewirken. Er kommt zu folgendem Schluß: „. . . Wäre auch überhaupt keine Fibrillärtextur mikroskopisch sichtbar, so müßte man eine durchgehende metamikroskopische (molekulare) Fibrillierung auf Grund des optischen Verhaltens annehmen. . . .

. . . Wir gehen also von der Annahme aus, daß auch im glatten Muskel in letzter Linie die kontraktile Masse in Molekularfibrillen zerfällt, daß diese zu Bündeln verschiedener Ordnung gruppiert sind und daß bei einer gewissen Dicke der Bündel diese als histologische Fibrillen sichtbar werden können, sofern nämlich der effektive Zwischenraum zwischen je zwei Bündeln so groß ist, daß derselbe über die Schwelle der mikroskopischen Wahrnehmung emportritt. . . . Man täusche sich hier über das Erreichbare nicht! Die wahren elementaren Einheiten, Molekularfibrillen oder Inotagmenreihen, mikroskopisch zu sehen, wird wahrscheinlich unmöglich sein."

Seit der Einführung des Elektronenmikroskops (Lit. s. Gansler 1960) konnte diese Frage weitgehend geklärt werden, da im Unterschied zum Skelettmuskel nur eine Art von Myofilamenten aufgefunden wurde. Der Durchmesser dieser Filamente wird unterschiedlich, jedoch mit höchstens 100 Å angegeben, weshalb sie lichtmikroskopisch nicht mehr erfaßt werden können. Außer diesen Filamenten wurden punkt- bis spindelförmige dichtere Strukturen beschrieben, deren Deutung noch aussteht. Die Frage des Zellverbandes wird unterschiedlich beurteilt: Shoenberg (1958) erzielte Bilder, die für die Annahme eines partiellen Syncytiums zu sprechen scheinen, während von den anderen Autoren durchgehende Zellmembranen beschrieben wurden. Über funktionell bedingte Unterschiede der Ultrastruktur von isolierten Muskelstreifen aus dem Froschmagen, von denen vor und während der Fixierung Mechanogramme registriert wurden[1], haben wir

[1] Gemeinsam mit dem Physiologischen Institut der Medizinischen Fakultät Homburg.

früher berichtet (GANSLER 1960). Es konnte gezeigt werden, daß Muskelzellen im erschlafften Zustand annähernd parallel verlaufen und dicht nebeneinanderliegen, im Stadium der isotonischen Kontraktion zapfenartig schräg angeordnet sind und weiter auseinanderliegen. Die Erweiterung des Extrazellularraums ließ sich in Übereinstimmung mit den Befunden von MEIGS mit der Entquellung von Muskelzellen in Beziehung bringen. Dieser anisodimensionalen Schrumpfung bzw. Volumabnahme des Myoplasmas entspricht eine Zunahme der Farbaffinität bzw. des Kontrastes oder der Dichte des Myoplasmas sowie die Ausbildung stachelförmiger Zelloberflächen. Hieraus ergab sich die Frage, inwieweit diese Befunde auf in situ befindliche Totalorgane übertragen werden können. Da in situ einheitliche Funktionszustände nicht zu erwarten sind, achteten wir besonders auf etwaige Unterschiede zwischen ruhenden und tätigen Muskeln (Darm von Hungertieren, Uteri von trächtigen und von kastrierten Ratten).

Außerdem soll auf die Frage nach den durch Präparation und Fixierung möglicherweise hervorgerufene Strukturänderungen eingegangen werden.

B. Material und Methode

I. Intestinaltrakt. Lichtmikroskopie: Colon und Caecum von 8 Meerschweinchen, Colon und Caecum von 6 Ratten, Dünndarm (menschliches Operationsmaterial). Fixierung: Formol; Einbettung: Paraffin; Färbung: Azan, Hämatoxilin-Eosin und van Gieson.

Elektronenmikroskopie: Je 6—8 Muskelstückchen aus dem Caecum und Colon von 6 Meerschweinchen und 4 Ratten. Von einem frisch entnommenen menschlichen Darm (Operationsmaterial) wurden Muskelstückchen an verschiedenen Stellen entnommen.

II. Uterus. Lichtmikroskopie: 8 normale Ratten-Uteri in verschiedenen Cyclusphasen- 6 Kastraten-Uteri; 12 Kastraten-Uteri mit anschließender Ovocyclinbehandlung. Die Tiere wurden 2, 4, 6 und 14 Tage nach der Hormoninjektion getötet. 12 Kastraten-Uteri mit anschließender Progesteron-Behandlung; Tötung der Tiere in den gleichen Intervallen nach der Progesteron-Injektion. 4 Kastraten-Uteri mit anschließender Ovocyclin- und Progesteron-Injektion. Die erste Hormoninjektion erfolgte 4 Wochen nach Kastration. — Fixierung: Carnoy, Bouin und Formol. Einbettung Paraffin. Färbung: H. E. Masson und van Gieson.

Elektronenmikroskopie: Aus den Uteri wurden aus verschiedenen Abschnitten der Uterushörner, aus dem cervixnahen Uterus bicornis je 4—6 Muskelstückchen entnommen. Uteri von folgenden Ratten wurden untersucht; 4 normale Ratten in verschiedenen Cyclusphasen, 3 Uteri 14 Tage und 4 Wochen nach Kastration, 2 infantile Uteri, 2 foetale Uteri, 5 Kastraten-Uteri; nach 4 Wochen einmalige Injektion von 1 mg Ovocyclin „M" (Ciba). Tötung nach 8 und 15 Std, 2, 4, 8 und 15 Tagen nach Injektion. Drei Kastraten-Uteri, die nach 8tägiger FH-Wirkung 20 mg Progesteron subcutan erhielten und nach 1, 3 und 7 Tagen getötet wurden.

Fixierung und Einbettung der elektronenmikroskopischen Präparate:

1. Als Fixierungsflüssigkeit wurde routinemäßig eine 1%ige gepufferte Osmiumtetroxyd-Lösung nach CAULFIELD (1957) von etwa 4° C verwandt. (Für eine optimale Fixierung ist es erforderlich, das Fixierungsgemisch erst unmittelbar vor der Gewebe-Fixierung anzusetzen, da sonst OsO_4 reduziert wird. Nach einstündiger Fixierung im Eisschrank wird das Gewebe 2—3 min in Aqu. dest. gewaschen, dann in kontinuierlich ansteigender Alkoholreihe entwässert. Die Einbettung erfolgte in einem Butyl-Methyl-Methacrylatgemisch im Verhältnis 8:2 oder 7:1. Polymerisation 12—24 Std bei 60° C.

2. Zur Kontrastverbesserung wurde ein Teil der Gewebe nach der Entwässerung für 24 Std in eine 1%ige Phosphorwolframsäurelösung in absolutem Alkohol gebracht, anschließend in absolutem Alkohol gewaschen und in Methacrylat bzw. Araldit oder Vestopal eingebettet.

3. Eine Nachkontrastierung an Schnitten erfolgte durch Einlegen der Objektträger-Netze in eine gesättigte wäßrige Uranylacetatlösung.

Die Schnitte wurden mit Porter-Servall-Blum-Mikrotomen hergestellt. Für die phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen stand ein Wild-Varicolor-Mikroskop zur Verfügung. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit Siemens-Elektronenmikroskopen ÜM 60c[1] und Elmiskop I gemacht.

Abb. 1. Paraffin-Längsschnitt durch Meerschweinchen-Caecum. Im linken Bildteil Mesenterialansatz mit gewellt verlaufender Ringmuskulatur, die nur von Serosa bedeckt ist. Rechts gerade verlaufende Ringmuskulatur. Zwischen Serosa und Ringmuskulatur ein schmaler Streifen von Längsmuskulatur

C. Befunde

I. Lichtmikroskopische Befunde

1. Lebendbeobachtung am geöffneten Bauchsitus narkotisierter Meerschweinchen. Caecum und Colon ascendens sind für die Erfassung der in situ ablaufenden

[1] Herrn Professor Dr. Rolshoven möchten wir für die Anschaffung des Siemens-Elektronenmikroskopes ÜM 60c an dieser Stelle herzlich danken.

Bewegungsvorgänge besonders geeignet, weil hier größere Abschnitte der Darmwand nur aus Ringmuskulatur bestehen, d. h. unmittelbar von Serosa bedeckt sind. Zwei Drittel des Colon ascendens erscheinen als glattwandiges Rohr, an dem die äußere Längsmuskulatur als feine Längsstreifung zu erkennen ist. Das am Mesenterialansatz gelegene Drittel der Colon-Wand ist gewellt und zeigt zirkulär angeordnete Streifen bzw. Muskelbündel. Im gefüllten Zustand ist dieser Teil der Darmwand in ständiger Auf- und Abbewegung. In gleicher Bewegung sind auch die zwischen den Taenien des Caecum stark vorgewölbten Teile der Caecum-Ringmuskulatur, die wie die Haustren des menschlichen Colon aussehen.

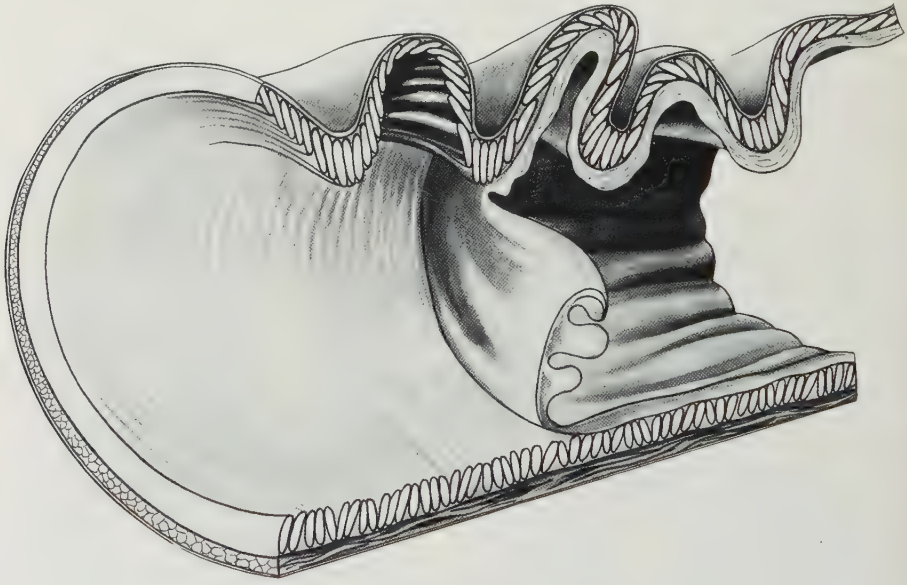


Abb. 2. Plastische Skizze zu Abb. 1

Gerade diese Motilitätsform weist darauf hin, daß an der Enger- und Weiterstellung von glattmuskulären Hohlorganen der *Zell*verband aktiv beteiligt sein muß. Daß auch isolierte Muskelstreifen nach Entfernen von Serosa und Submucosa normale rhythmische Kontraktionen ausführen, schränkt die funktionelle Bedeutung des Scherengitters ebenfalls ein. Die Reaktion einzelner Darmabschnitte auf äußere Eingriffe wie Bespülen mit Fixierungsflüssigkeit oder Herausschneiden von Muskelstückchen kann als stürmische Kontraktion oder ohne erkennbare Veränderungen ablaufen. Gewebe, das sowohl auf Herausschneiden als auch auf in situ-Fixierung sehr heftig reagiert, ist für die histologische Untersuchung besser geeignet, wenn es in situ fixiert wird, da bei der Kontraktion die Architektur des Gesamtorgans besser erhalten bleibt. Die Kontraktion nach dem Herausschneiden führt stets zu einer spiraligen Verdrehung der gesamten Muskelwand.

2. Befunde an Paraffinschnitten. Abb. 1 zeigt einen Längsschnitt durch das Colon ascendens. Im Bild links ist der gewellte Teil, rechts der glattwandige Teil der Ringmuskulatur zu sehen. Im gewellten Abschnitt der Ringmuskulatur sind die Muskelbündel in den Wellentälern annähernd radiär gestellt, auf den

Wellenbergen mehr tangential. Die hieraus resultierenden Unterschiede der Wanddicke sind am eindrucksvollsten an Querschnitten. Vergleichen wir den Abschnitt mit dem glattwandigen Bereich, in dem die Muskelbündel alle an-

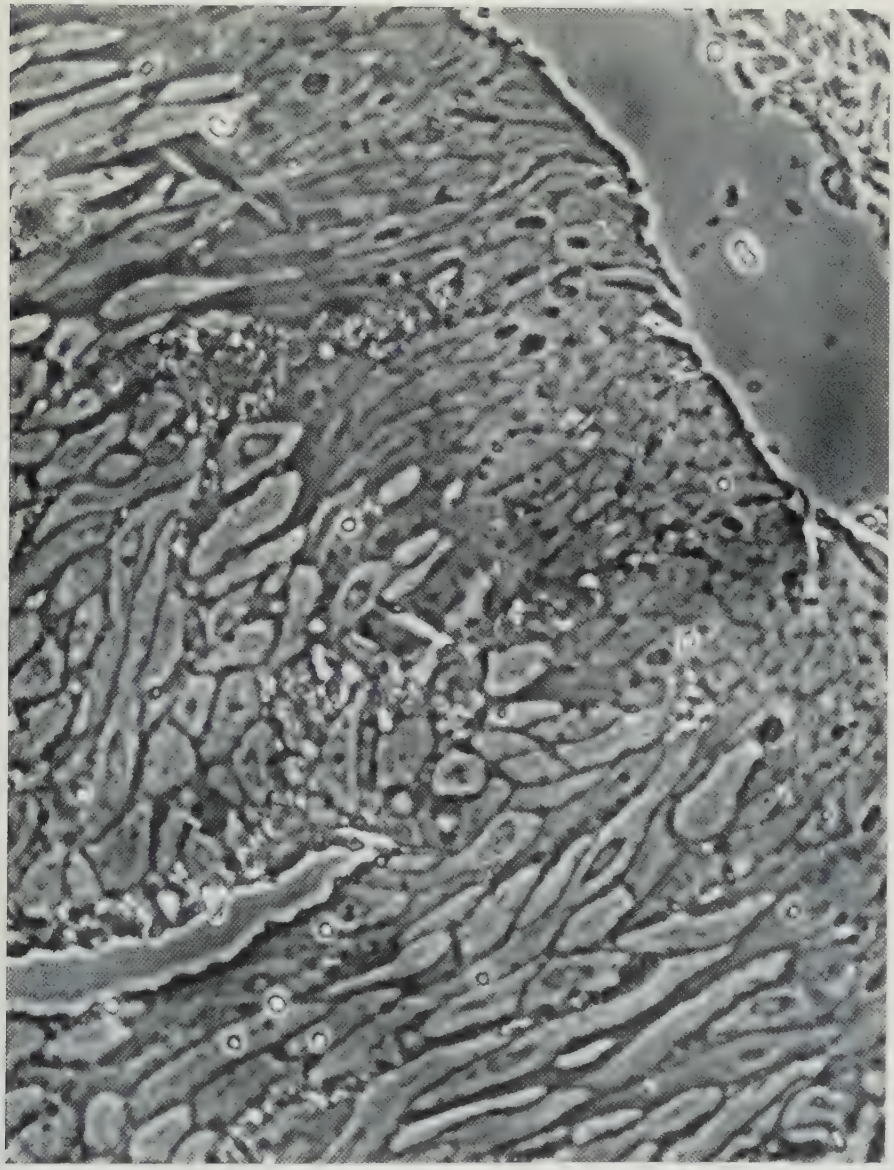


Abb. 3. Ringmuskulatur aus dem menschlichen Dünndarm. Große helle und kleinere dunkle Muskelzellen dicht nebeneinander. Phasenkontrastmikroskop. Vergr. 1000fach. Arch. Nr. 165/60

nähernd gestellt sind, so fällt auf, daß das am Mesenterialansatz gelegene Drittel der Ringmuskulatur nach außen an die Serosa grenzt, nach innen an die Mucosa bzw. Submucosa. Es fehlt also in diesem Bereich sowohl die äußere Längsmuskulatur als auch die Muscularis mucosae (Abb. 1 u. 2). Die gleichen Befunde

ergeben sich am Caecum des Meerschweinchens, mit dem Unterschied, daß hier die Längsmuskulatur auf die schmalen Taenienstreifen reduziert ist. Bei stärkerer

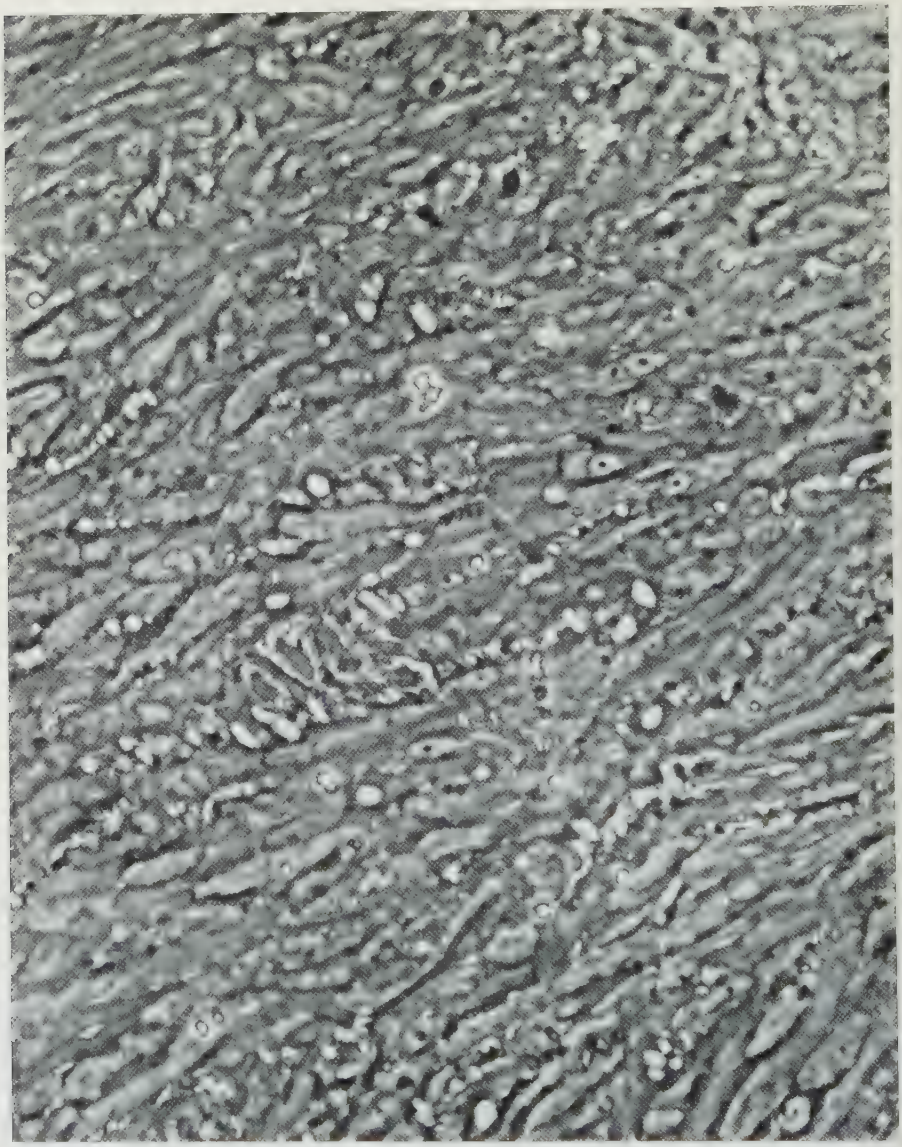


Abb. 4. Andere Stelle des gleichen Schnittes wie in Abb. 3. Der Zellverband besteht aus annähernd kontrastgleichen Muskelzellen, die nach Art eines Fischgrätmusters angeordnet sind. Zwischen den Zellen zahlreiche Vakuolen verschiedener Größe. Phasenkontrastmikroskop. Vergr. 1000fach. Arch.Nr. 167/60

Vergrößerung sieht man, daß in den Muskelbündeln heller und dunkler gefärbte Muskelzellen nebeneinander vorkommen. Dabei sind die dunklen Zellen leicht als Zellindividuen zu erkennen, während die helleren Zellen häufig Zellgrenzen haben und als vielkerniges Syncytium erscheinen.

3. Phasenkontrastmikroskopische Befunde. Die phasenkontrastmikroskopische Betrachtung dickerer Schnitte der in Methacrylat eingebetteten Muskelstückchen gewährleistet neben einer höheren Auflösung zugleich noch einen Überblick über den gesamten Zellverband.

Werden diese so zugeschnitten und eingebettet, daß die jeweilige Ring- bzw. Längsmuskulatur annähernd horizontal oder vertikal im Blöckchen liegt und

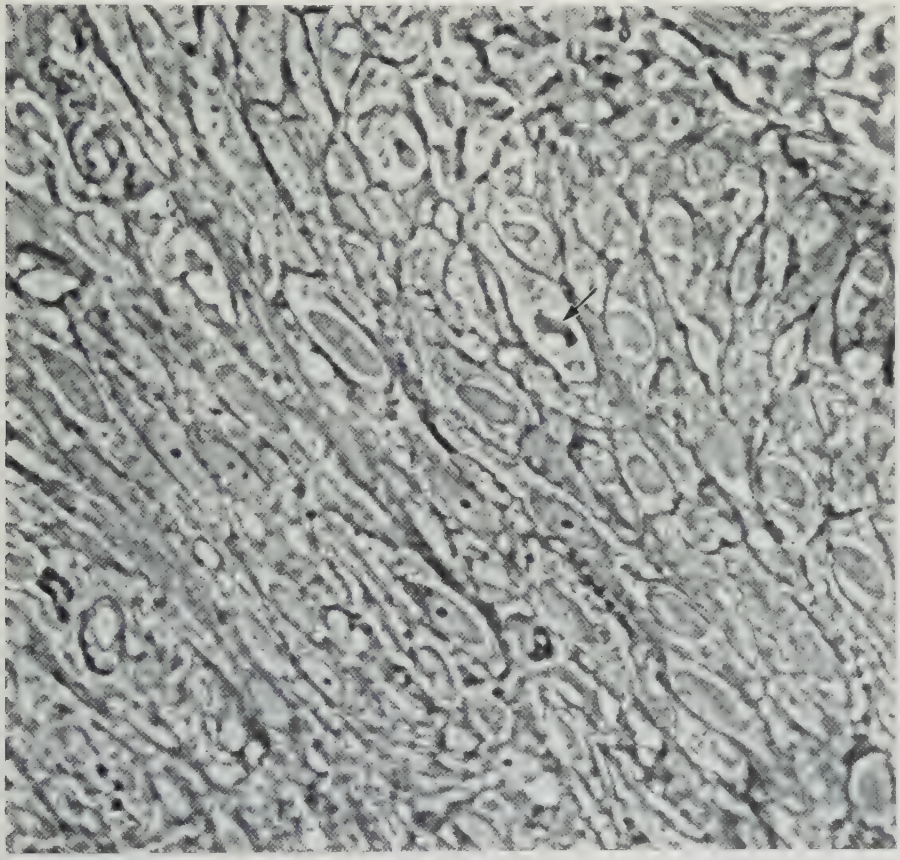


Abb. 5. Uterus-Muskulatur unter FH-Wirkung: Große helle Zellen mit spindelförmigen Kernen. An der mit Pfeil markierten Stelle dunkler verbogener Kern mit Kernvakuole. Phasenkontrastmikroskop. Vergr. 1000fach. Arch. Nr. 53/61

werden relativ große Flächen geschnitten (3—4 mm²), so ist auch die topographische Orientierung gut möglich.

a) Darm-Muskulatur. Schnitte durch in situ fixierte Darmabschnitte lassen verschiedene Zelltypen nebeneinander erkennen:

1. Der Zellverband erscheint gleichförmig und strukturarm. Nur gelegentlich können Zellkerne und Zellgrenzen wahrgenommen werden. Erst im Elektronenmikroskop werden in diesen gleichförmigen Zellverbänden Strukturen sichtbar. Dieser Zelltyp ist vorwiegend in Därmen anzutreffen, die in stark gefülltem Zustand in situ fixiert wurden.

2. Der Zellverband ist ungleichförmig; die Zellen verlaufen mehr oder weniger schräg zueinander. Die Abb. 3 und 4, die von nebeneinanderliegenden Stellen eines Schnittes gemacht wurden, zeigen die verschiedenen Formen solcher Zellverbände: In Abb. 3 lassen sich alle Zellen durch kontrastreichere Linien deutlich gegeneinander abgrenzen. Während am oberen Rand die Zellgrenzen nur wenig kontrastreicher sind als das Myoplasma, fallen im unteren Bildteil hellere größere Zellen auf. In Abb. 4 haben die Zellen alle etwa gleichen Kontrast; sie sind nach Art eines Fischgrätmusters angeordnet. Neben kontrastreicheren Zellgrenzen sind zahlreiche Vakuolen im Extrazellularraum zu sehen. In der Nähe solcher Zellverbände findet man stets auch unterschiedlich große Areale typischer „Stachelzellen". Diese verschiedenen Typen ungleichförmiger Zellverbände kommen stets nebeneinander vor und zwar oft schon in einem einzigen Schnitt. Außerdem läßt sich an Hand von Serienschnitten verfolgen, daß die gleiche Stelle der Muskelwand, z. B. die der Serosa unmittelbar anliegende Zellschicht, in verschiedenen Schnittebenen ebenfalls verschiedene Zelltypen aufweist. Dieser Befund läßt von vornherein ausschließen, daß die verschiedenen Zelltypen durch ein unterschiedlich schnelles Eindringen der Fixierungsflüssigkeit zustande kommen. Andererseits weist er darauf hin, daß die Fixierungsflüssigkeit feine Strukturunterschiede gleichzeitig fixierter Zellen, nämlich die der Serosa unmittelbar anliegenden, nicht verwischt. Muskelstückchen, die erst nach dem Herausschneiden fixiert wurden, bestehen ebenfalls aus gleichförmigen und ungleichförmigen Zellverbänden. Außerdem beobachteten wir bei diesem Material einen Zelltyp, der an in situ fixiertem Gewebe nicht vorkommt: Helle Zellen mit einem kontrastreicheren Zentrum (vgl. Abb. 8).

b) Uteri. Die Befunde an Uteri geschlechtsreifer Ratten unterscheiden sich nicht prinzipiell von denen an Darm-Muskulatur. Jedoch läßt sich unter der Einwirkung von Follikelhormon in der Oestrusphase und noch eindeutiger im experimentell erzeugten Dauer-Oestrus die Zunahme heller Muskelzellen beobachten (Abb. 5). Die an Paraffinschnitten zwischen diesen Muskelzellen zahlreich zu beobachtenden ringkernigen Zellen lassen sich an entsprechend dünneren Schnitten (0,1—0,5 μ) nicht beobachten. Fokussiert man Paraffinschnitte mit solchen Ringkernen, so stellt man fest, daß die Kerne nicht in einer Ebene liegen: mit abnehmender Schnittdicke sieht man nun im Phasenkontrastmikroskop nicht mehr die ganzen Ringkerne, sondern nur zwei oder mehrere Kernanschnitte in derselben Zelle. Gelegentlich lassen sich auch spiralig verdrehte Kerne in einer Muskelzelle beobachten, denen manchmal Vakuolen anliegen (Pfeil in Abb. 5). In der Submucosa und in der Muscularis sieht man außerdem Zellen mit osmiophilen Granula (GANSLER 1956). Wird Tieren mit Dauer-Oestrus zusätzlich Progesteron verabreicht, so ist schon nach 1—2 Tagen eine Abnahme der hellen Zellen zu beobachten.

II. Elektronenmikroskopische Befunde

1. Darm-Muskulatur. Bei schwacher elektronenmikroskopischer Vergrößerung fallen vor allem die Dichteunterschiede der Muskelzellen bzw. des Myoplasmas auf. Die Zellformen, deren Zell- und Kerngrenzen im Phasenkontrastmikroskop deutlich kontrastreicher sind, können nun in zwei weitere Gruppen unterteilt werden: Zell- und Kernmembran sind gestreckt (Abb. 6) oder gefaltet (Abb. 7);

in beiden Fällen handelt es sich um annähernde Längsschnitte. Die Zellmembranen sind dichter als das Myoplasma; gemeinsam sind ferner die punktförmigen Verdichtungen im Myoplasma. Eine gewisse Vorzugsrichtung der

Abb. 6. Muskelzellen aus dem Rattendünndarm. Zell- und Kernoberflächen glatt. Das Myoplasma läßt an der Vorzugsrichtung parallel zur Längsachse der Zellen erkennen: punkt- bis spindelförmige Verdichtungen unregelmäßig im Myoplasma verteilt. Säulenförmig angeordnete Mitochondrien. Vergr. El. opt. 6000fach. Arch. Nr. 1969/60

Myofilamente ist in Abb. 6 erkennbar, fehlt aber bei dem Zelltyp der Abb. 7. Außerdem sind Mitochondrien und Zellkerne in Abb. 7 vorwiegend schräg oder

Abb. 7. Meerschweinchen-Caecum. Die Muskelzellen verlaufen schräg zueinander, die Zelloberflächen sind leicht gewellt und ineinander verzahnt. Von den schraubig verdrehten Kernen sind nur kleinflächige Anschnitte zu sehen. Das Myoplasma, in dem punktförmige Verdichtungen verteilt sind, läßt eine Vorzugsrichtung nicht erkennen. Vergr. El. opt. 2500fach. Arch. Nr. 2867/60

quer angeschnitten, was darauf hinweist, daß die Längsachse des Zellkerns und der Mitochondrien nicht mit der Längsachse der Zelle zusammenfällt. Die Zellen der Abb. 9 unterscheiden sich von denen der Abb. 7 durch noch geringere Dichte-

Unterschiede von Myoplasma, Zell- und Kernmembran. An einzelnen Stellen (s. Pfeil) kann die Zellgrenze kaum wahrgenommen werden. Auffallend sind

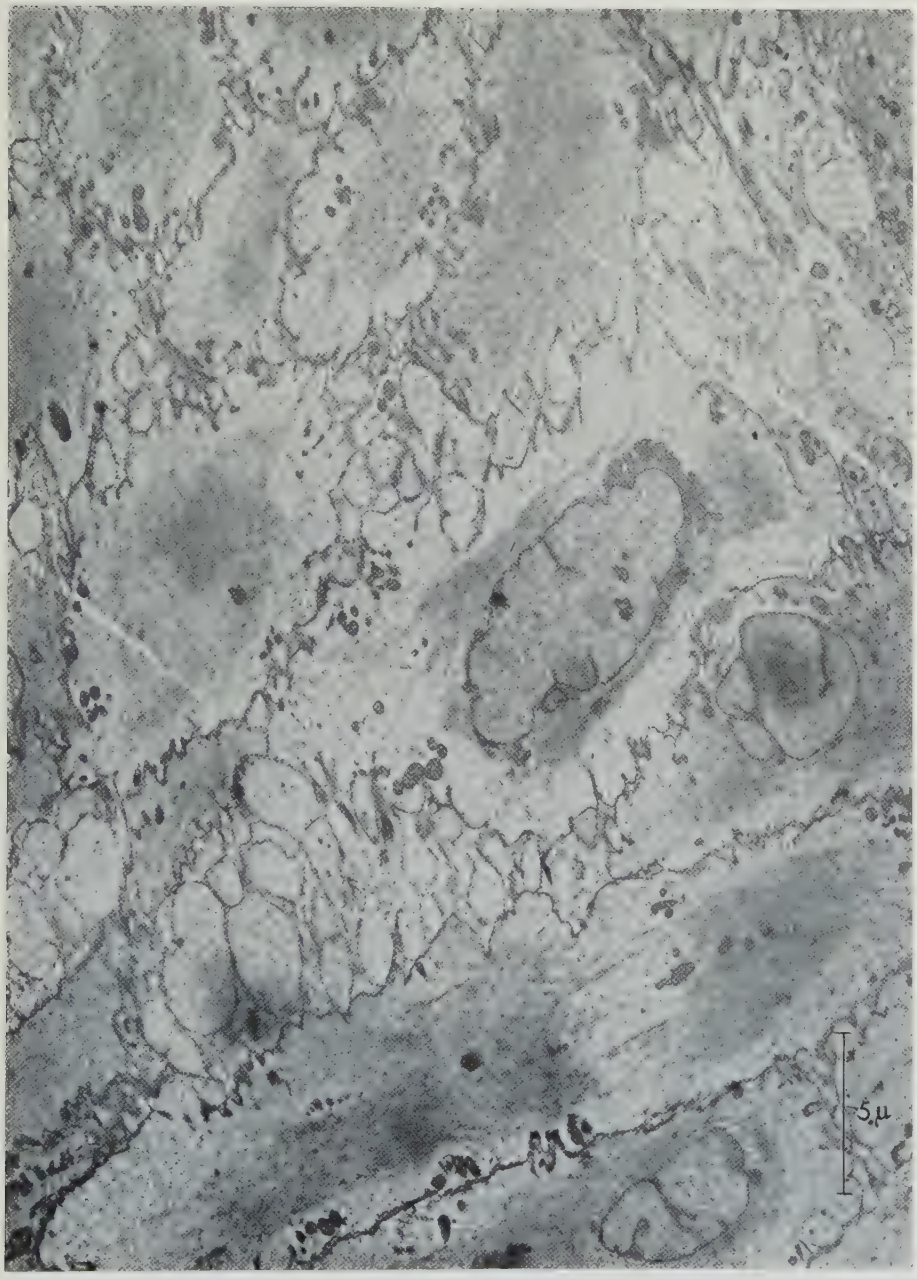


Abb. 8. Meerschweinchen-Caecum, das erst nach dem Herausschneiden fixiert wurde. Schräg zueinander verlaufende und ineinander verzahnte Muskelzellen. Die Kerne sind ebenfalls schraubenförmig verdreht, das Myoplasma ist in der Peripherie heller als in den zentralen Bereichen. Im unteren Bildteil scheinbar zahlreiche Vakuolen, bei denen es sich jedoch um flach angeschnittene Zellausläufer tiefer gelegener Zellen handelt. Vergr. El. opt. 1500fach. Arch. Nr. 594/60

zahlreiche, unterschiedlich große Vakuolen und Bläschen in Nachbarschaft der Kernpole und der Zelloberfläche. Auch hier verlaufen die Zellen nicht parallel zueinander. Verschiedene Formen der Stachelzellen sind in Abb. 10 und 11

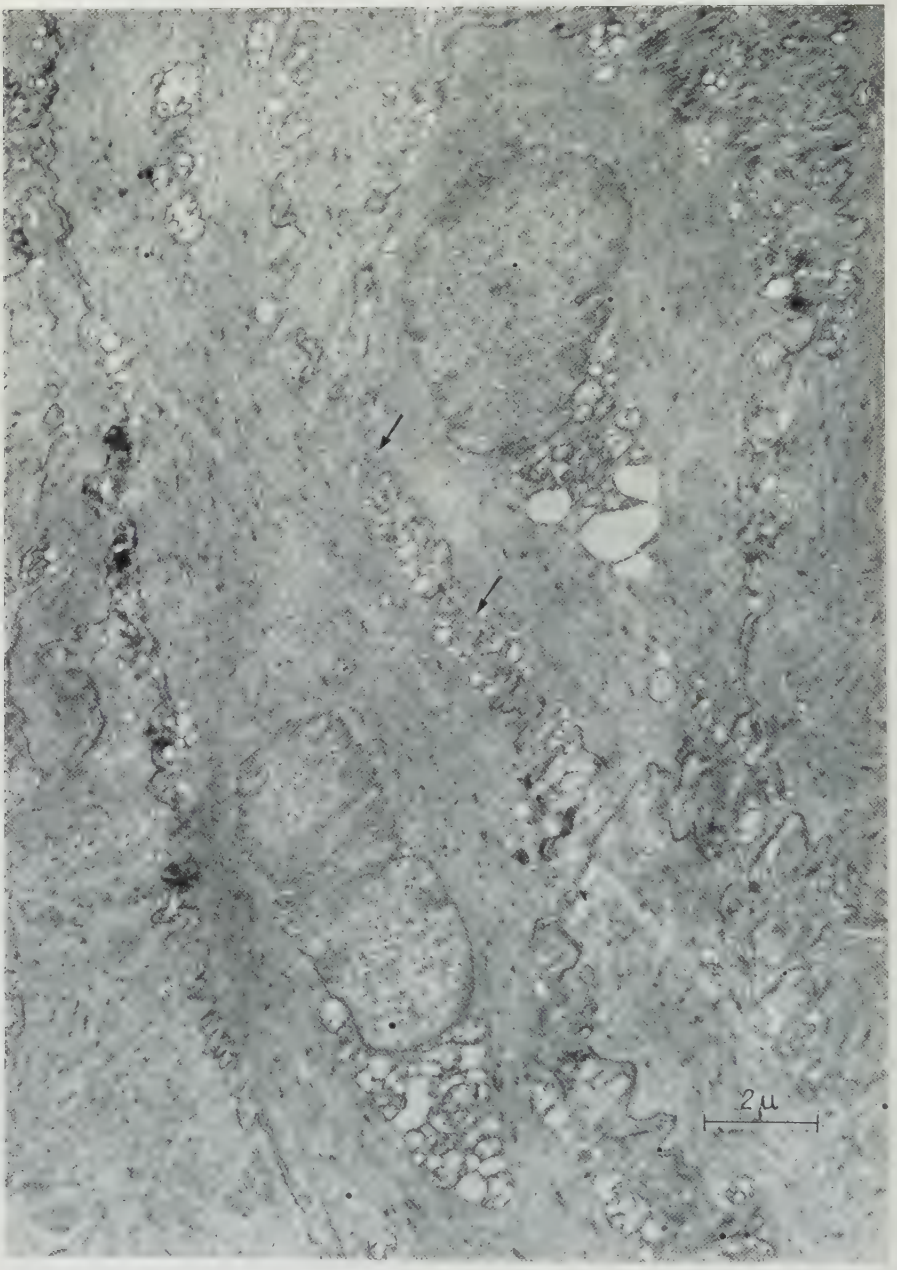


Abb. 9. Meerschweinchen-Caecum. Ähnlicher Zellverband wie in Abb. 7, jedoch sind die Zellgrenzen infolge zu geringer Dichteunterschiede zwischen Myoplasma und Zellmembran weniger gut zu erkennen, der Zellverband erscheint syncytial. Gruppen von Bläschen und Vakuolen an der Zelloberfläche und um die Kernpole. Vergr. El. opt. 2500fach. Arch. Nr. 1284/61

wiedergegeben. Neben typischen Stachelzellen sehen wir im unteren Teil von Abb. 10 noch dichter nebeneinanderliegende Zellen, in denen vereinzelt (s. Pfeil)

Abb. 10. Meerschweinchen-Caecum. Unterschiedlich dichte Stachelzellen, an einzelnen Stellen ist die Zellmembran benachbarter Zellen noch ineinander verzahnt. Gelegentlich sieht man statt der dunklen stachelähnlichen Zellausläufer breitbasige helle Vorwölbungen der Zelloberfläche (s. Pfeil). Vergr. El. opt. 2500fach. Arch. Nr. 3358/60

peripher hellere Myoplasmabezirke auffallen. In Abb. 11 ist der Übergang von sehr dichten Stachelzellen in hellere Zellen mit flach gewellter Zellmembran zu sehen. Zwischen dieser und der in Abb. 12 dargestellten Zellform gibt es

zahlreiche Übergänge: Die Zellabstände werden kleiner, das Myoplasma zeigt eine gewisse Vorzugsrichtung zur Längsachse der Zellen, sowie zahlreiche spindelförmige Verdichtungen. Die angeschnittenen Zellkerne sind länglich und haben mehr oder weniger tiefe Einschnürungen. Die dichten Zellverbände, die im

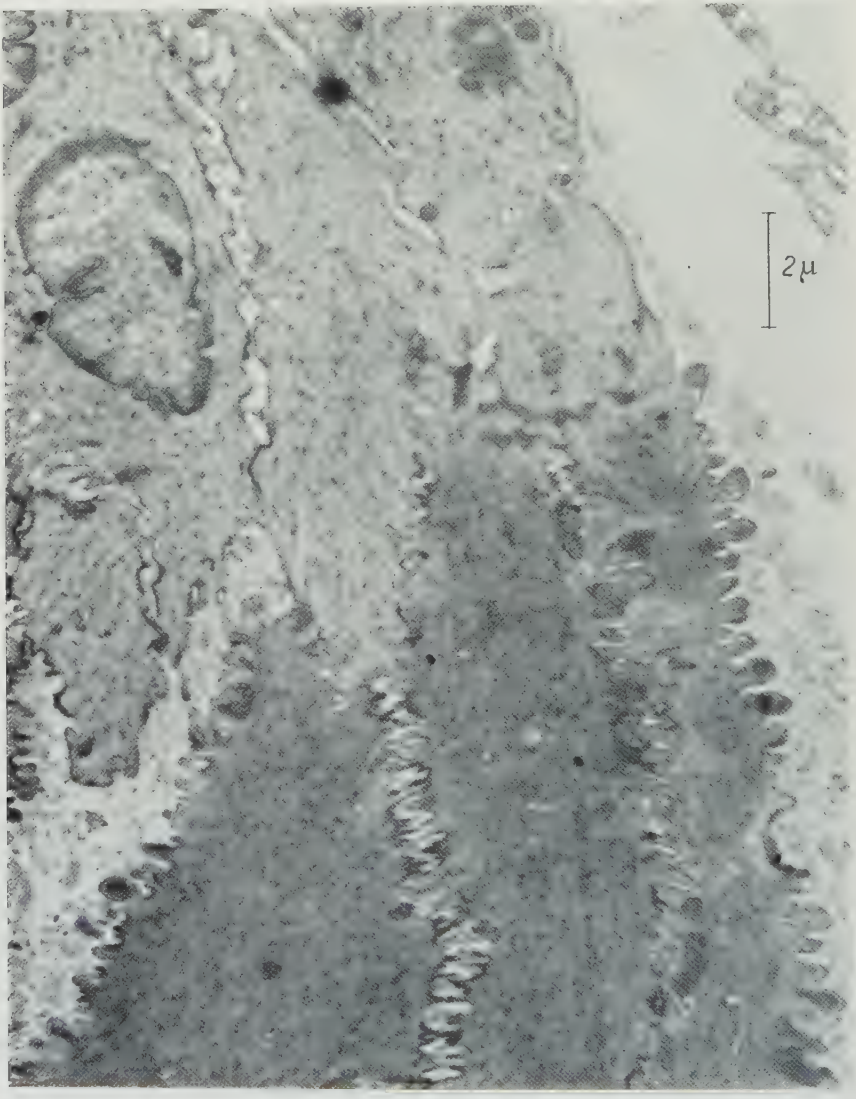


Abb. 11. Meerschweinchen-Caecum. Drei angeschnittene Stachelzellen im unteren Bildteil. Hellere Zellen mit nur leicht gewellten Oberflächen im Bild oben. Vergr. El. opt. 2500fach. Arch. Nr. 1744/60

Phasenkontrastmikroskop sehr strukturarm erscheinen, lassen im Elektronenmikroskop ähnliche Zelltypen wie die bisher beschriebenen erkennen; der Unterschied besteht lediglich in der größeren Dichte des Myoplasmas in allen Zelltypen.

2. Uteri unter extremen Hormonbedingungen. Die Muskelzellen von infantilen oder kastrierten Uteri sind gleichförmig (Abb. 13a). In den hellen Zellen nach Follikelhormon-Applikation (Abb. 13b) ist nur noch eine unterschiedlich breite

Randzone mit Myofilamenten zu sehen. Der zentrale Zellbereich besteht aus einer hellen Grundsubstanz, in der Mitochondrien, Bläschen und endoplasmatisches Retikulum zu sehen ist. Die hellen Zellkerne liegen oft exzentrisch. Abb. 14 zeigt Muskelzellen nach zusätzlicher Progesterongabe.

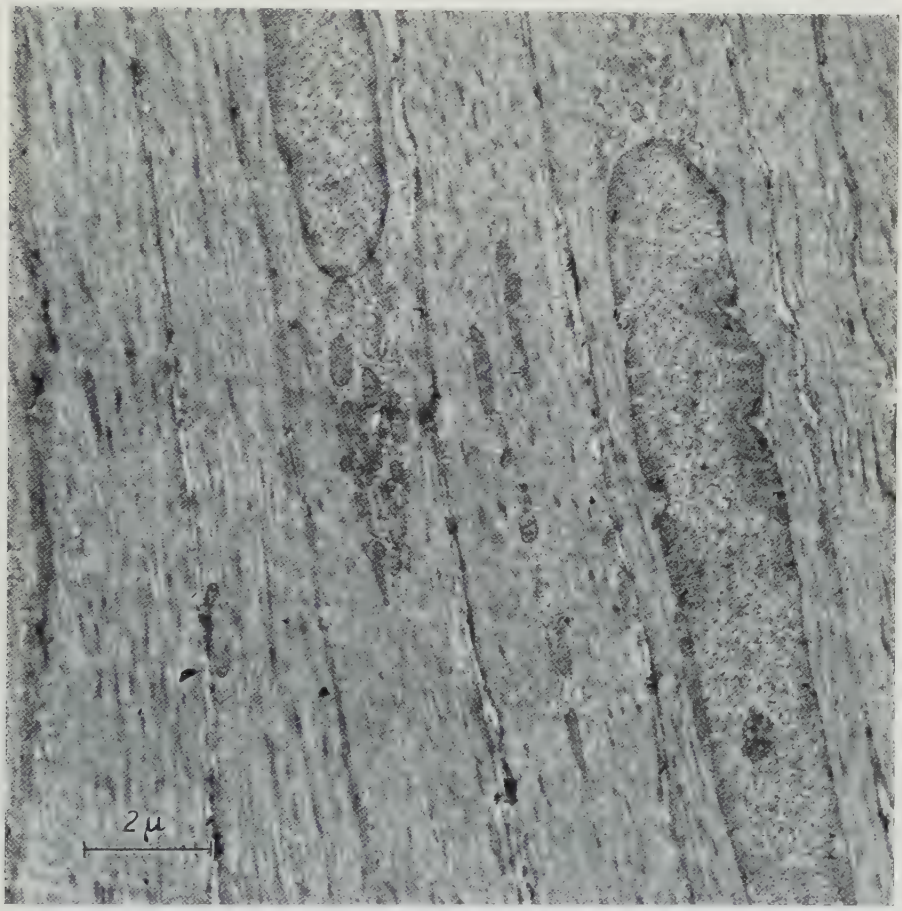


Abb. 12. Meerschweinchen-Caecum. Parallel verlaufende Muskelzellen mittlerer Dichte mit parallel orientierten Myofilamenten und spindelförmigen Verdichtungen, die langgestreckten Kerne haben keine ganz glatte Oberfläche. Vergr. El. opt. 2500fach. Arch. Nr. 2524/60

3. Gefäße. An den Arteriolen kommen die verschiedenen Zellformen besonders gut im Zusammenhang mit der Enger- oder Weiterstellung der Gefäße zur Darstellung. So zeigt Abb. 15 je einen Querschnitt einer enger und einer weiter gestellten Arteriole. Die Arteriole mit weitem Lumen zeigt im Querschnitt vorwiegend quer angeschnittene, helle Muskelzellen, die mit engem Lumen mehr längs angeschnittene dunkle Zellen. Das heißt, daß die Muskelzellen in weiter gestellten Arteriolen gequollen sind und in steileren Schraubentouren verlaufen, in enger gestellten entquollen und in sehr flachen Touren angeordnet sind.

4. Die Feinstruktur der glatten Muskelzelle. *a) Das Myoplasma.* Zum Myoplasma im engeren Sinne möchten wir auf Grund der elektronenmikroskopischen Befunde die Myofilamente, die punkt- oder spindelförmigen Verdichtungen und

das Sarkoplasma rechnen. Das Sarkoplasma erscheint immer strukturlos, während die fädigen Elemente in Abhängigkeit von Kontrast- bzw. Dichteunterschied zwischen Sarkoplasma und Filamenten mehr oder weniger gut zur Darstellung kommen. In Zellen mittlerer Dichte (Abb. 16) können parallel

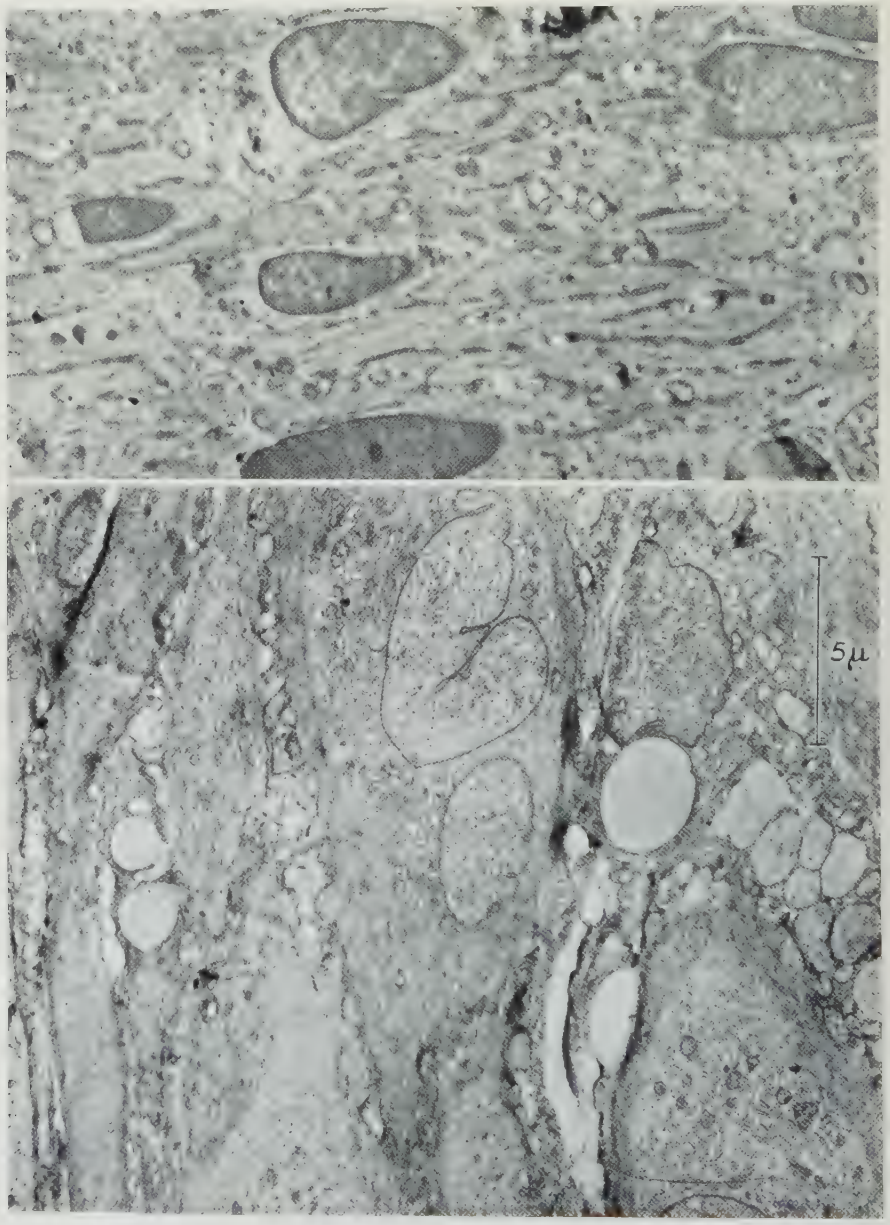


Abb. 13. a Muskelzellen aus einem Kastraten-Uterus. Vergr. El. opt. 1300fach. Arch. Nr. 1100/58. b Muskelzellen aus dem Ratten-Uterus nach FH-Wirkung. Die hellen Kerne sind spiralig verdreht und häufig in einer Zelle mehrfach angeschnitten. Im rechten Bildteil unmittelbar dem Kern anliegende große Vakuole. Nur in den peripheren Bereichen sind noch schmale Zonen von Myofilamenten zu erkennen. Vergr. El. opt. 2500fach. Arch. Nr. 1306/61

orientierte Einzelfilamente, spindelförmige Verdichtungen und ein strukturloses Sarkoplasma gut gegeneinander abgegrenzt werden, während in hellen und

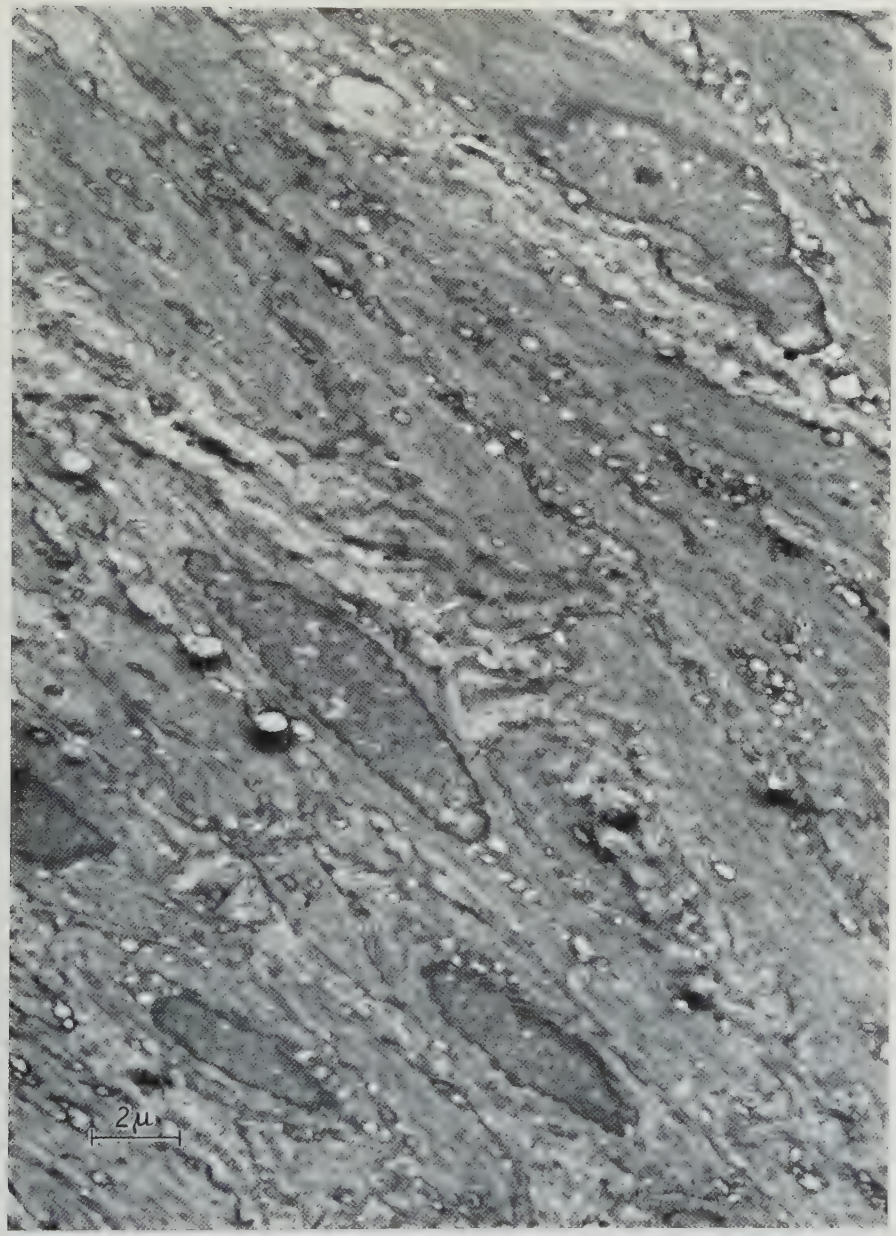
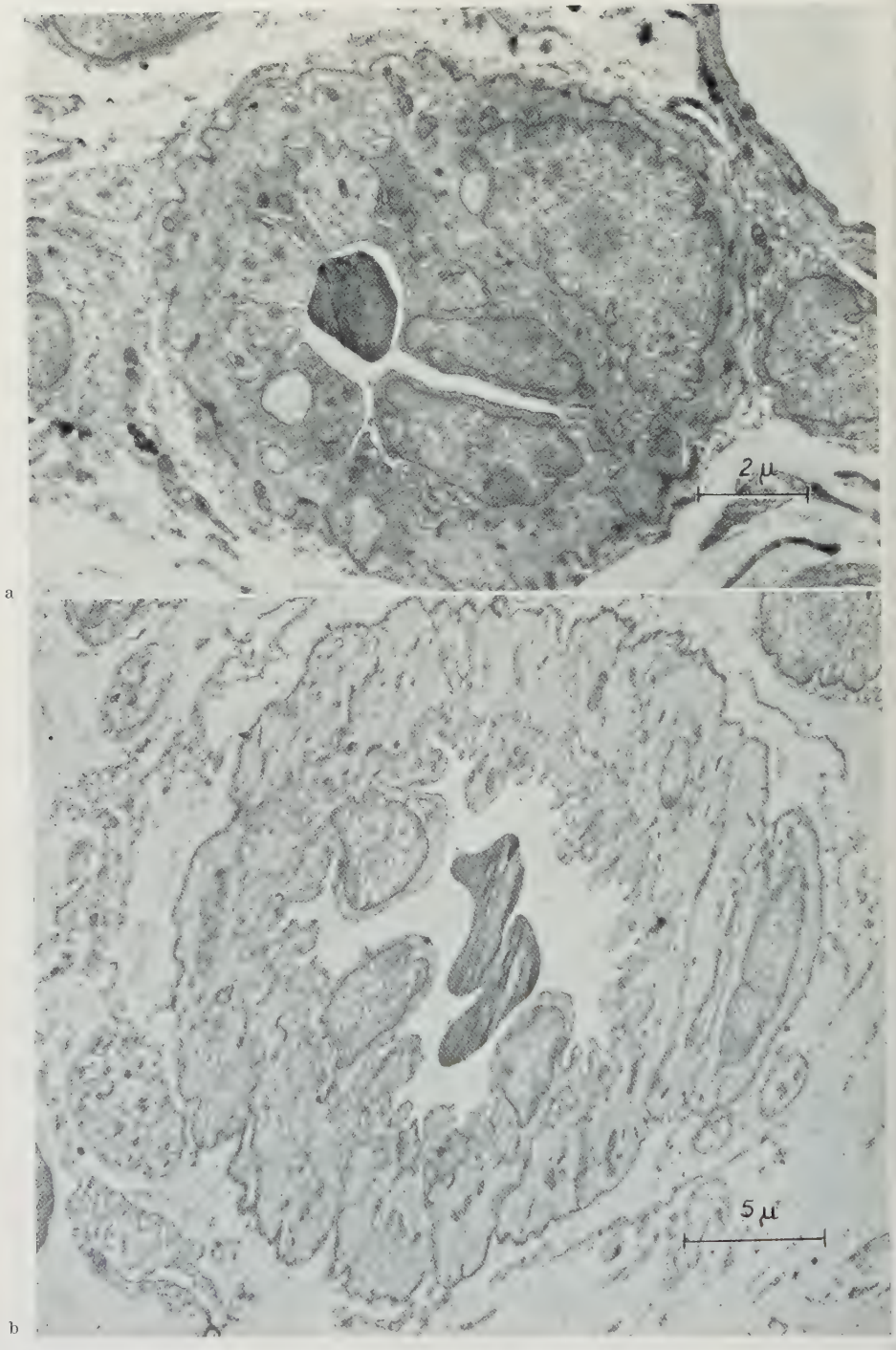


Abb. 14. Ratten-Uterus unter FH-Wirkung mit anschließender Progesteron-Applikation. Das Myoplasma ist dichter, ebenso die langgestreckten Zellkerne. Vergr. El. opt. 1300fach. Arch. Nr. 12925/57

dunklen Zellen das Myoplasma mehr oder weniger homogen erscheint: die einzelnen Bestandteile des Myoplasmas werden nicht distinkt dargestellt. Erst



a

b

Abb. 15. a Arteriole mit spaltförmigem Lumen. Die dichten Muskelzellen sind annähernd längs geschnitten. Vergr. El. opt. 2500fach. Arch. Nr. 1284/61. b Arteriole mit weitem Lumen. Die hellen Muskelzellen sind größtenteils quer angeschnitten. Vergr. El. opt. 1300fach. Arch. Nr. 2020/58

durch Nachkontrastierung am Schnitt lassen sich auch in solchen Zellen Filamente von 40—60 Å Durchmesser nachweisen. In sehr dichten, dunklen Zellen

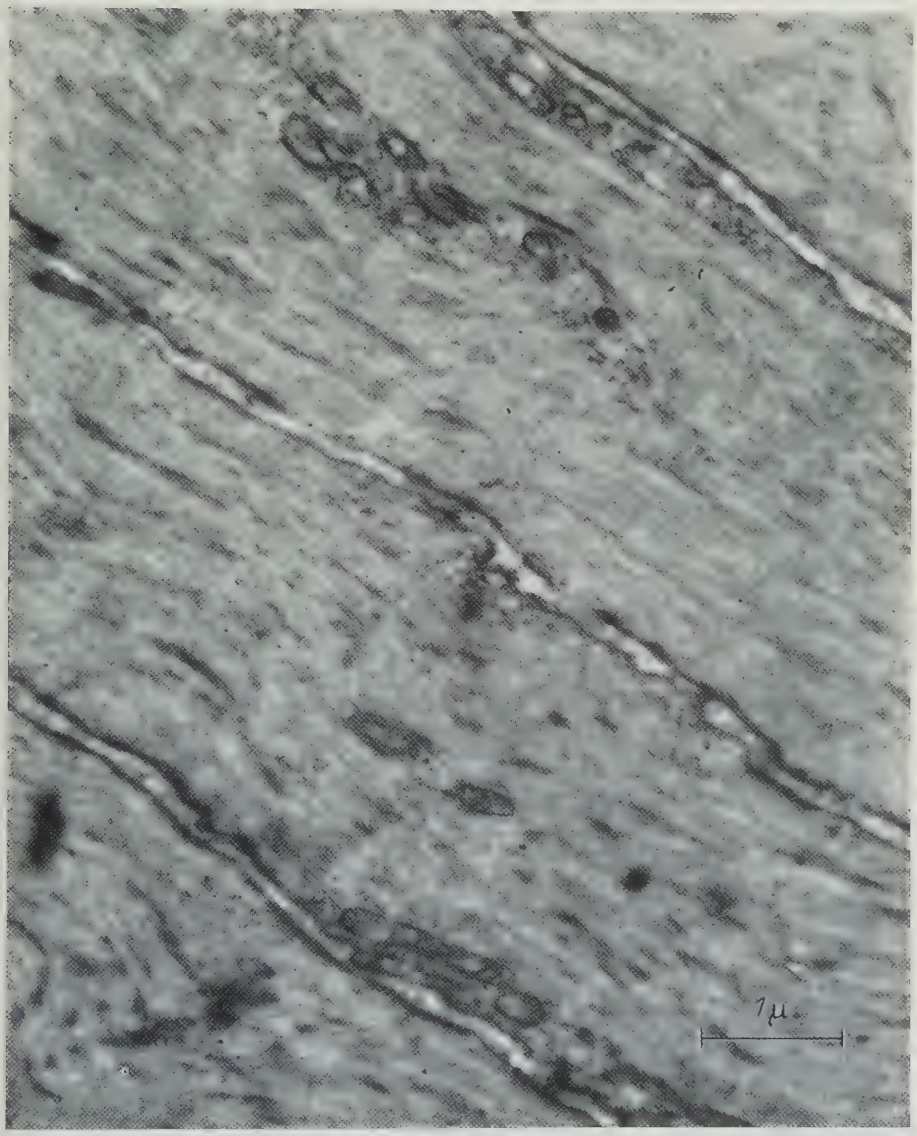


Abb. 16. Muskelzellen aus dem Dünndarm (Mensch). Myofilamente und spindelförmige Verdichtungen verlaufen parallel zueinander und zur Längsachse der Zellen. Die Zellmembran erscheint als durchgehende osmiophile Linie unterschiedlicher Dicke. Im Extrazellularraum vereinzelt Kollagenfibrillen. Vergr. El. opt. 6000fach. Arch. Nr. 1944/60

mit glatter Oberfläche (Abb. 18) zeigen die Filamente eine Vorzugsrichtung, die in dunklen Zellen mit gewellter Oberfläche fehlt (Abb. 19). Bei höherer Auflösung zeigt sich, daß die parallel orientierten Filamente in sehr dichten Zellen relativ weit auseinanderliegen (Abb. 20).

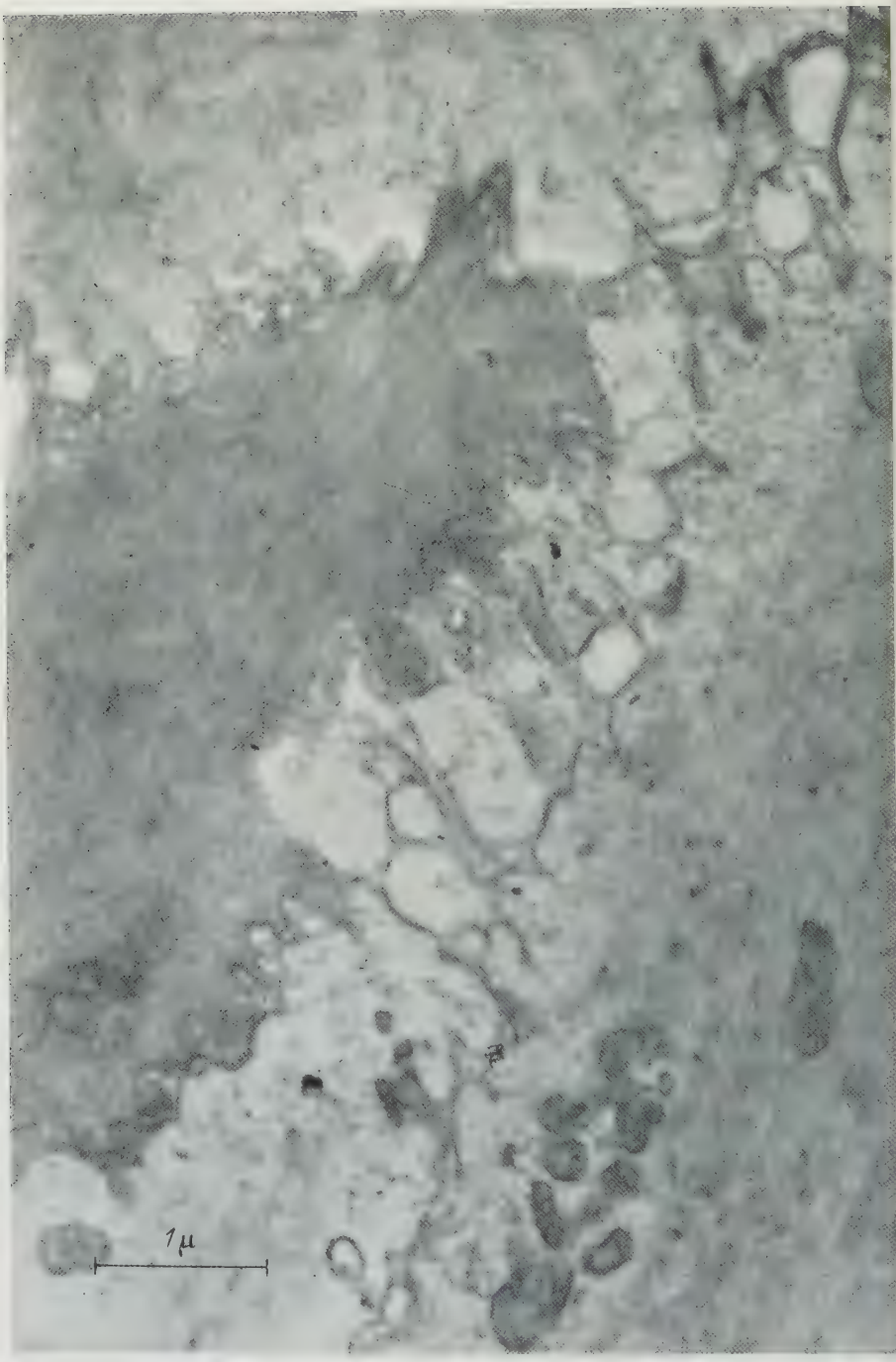


Abb. 17. Helle und dunkle Muskelzellen, erst nach dem Herausschneiden fixiert. Die Oberfläche der hellen Zellen zeigt breite amöboide Ausläufer, die der dunklen Zellen hat feine stachelähnliche Fortsätze. Keine anastomosierenden Zellausläufer. In beiden Zelltypen keine Vorzugsrichtung des Myoplasmas. Vergr. El. opt. 14000fach. Arch. Nr. 605/60

In *hellen* Zellen gelingt es nicht immer, durch Nachkontrastierung am Schnitt Filamente nachzuweisen. So ist in Abb. 21 ein lockeres Netzwerk von Filamenten zu sehen, während in Abb. 22 neben den spindelförmigen Verdichtungen nur ganz vereinzelt Filamente gegen das Myoplasma abgegrenzt werden können.

Abb. 18. Dunkle Zelle mit glatter Oberfläche; das Myoplasma zeigt an zahlreichen Stellen lange Myofilamente mit einem Durchmesser von etwa 40 Å. Die relativ breiten Zwischenräume zwischen diesen Filamenten bestehen aus einem fein granulierten Material. Der Schnitt wurde mit Uranylacetat nachkontrastiert. Vergr. El. opt. 30000fach. Arch. Nr. 1530/61

Auch die „Verdichtungen" zeigen erhebliche Unterschiede in Form und Massendichte. Ob diese punkt- oder spindelförmig zur Darstellung kommen, ist nicht nur eine Frage der Schnittrichtung, da in annähernd längs angeschnittenen Zellen sowohl punkt- als auch spindelförmige Verdichtungen zu sehen sind (vgl. Abb. 6 und 16). Wahrscheinlich handelt es sich um lange fädige Einheiten, die die Zelle in Längsrichtung durchziehen. Erscheinen sie im Dünnschnitt spindelförmig, so verlaufen sie annähernd gerade; die punktförmigen Anschnitte weisen auf einen gewundenen Verlauf hin. Neben der unterschiedlichen Dichte dieser Einheiten läßt Abb. 23 erkennen, daß es sich um Aggregate von geraden und gebogenen Filamenten handelt, die in ein unterschiedlich dichtes, homogenes

Material eingebettet sind. Daß es sich auch bei diesen Verdichtungen um funktionsabhängige Strukturen handelt, ergibt sich aus ihrem Fehlen in bestimmten

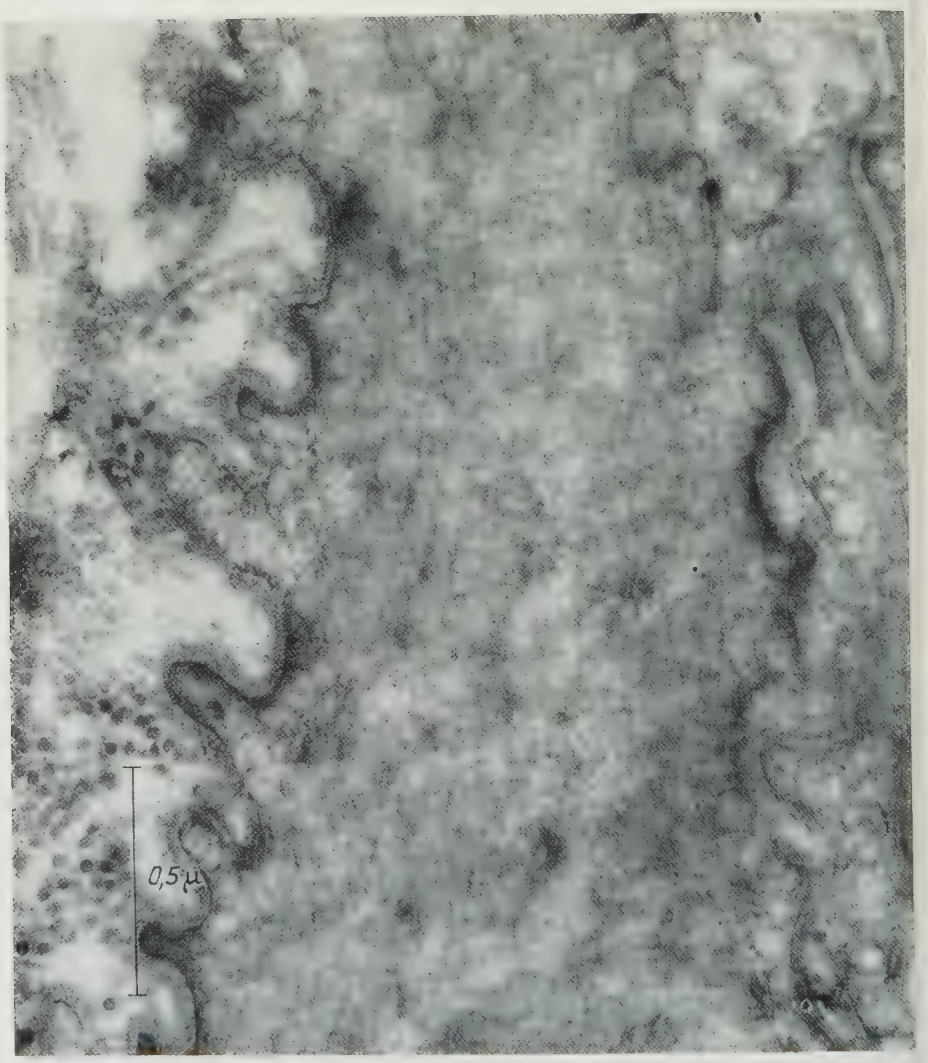


Abb. 19. Gleicher Schnitt wie in Abb. 18. Die dunkle Muskelzelle hat eine „stachlige" Oberfläche, das Myoplasma besteht aus sehr feinen ungeordneten Filamenten und vereinzelt punktförmigen Verdichtungen. Die Zellmembran hat keine einheitliche Struktur: Neben Stellen mit deutlicher Membranvesikulation sind Bereiche zu sehen, an denen der Membran zu beiden Seiten ein dichtes Material angelagert ist. Im Extrazellularraum quergestreifte Kollagenfibrillen. Vergr. El. opt. 20000fach. Arch. Nr. 1513/61

Typen heller und dunkler Zellen (Abb. 17) und ihrer massiven Zunahme in den Muskelzellen von Uteri trächtiger Ratten.

b) Der Zellmembrankomplex. Die glatten Muskelzellen sind durch eine Zellmembran gegen den Extrazellularraum bzw. die Nachbarzellen abgegrenzt, die bei günstiger Schnittführung als osmiophile Linie von etwa 100 Å Dicke erscheint. In den meisten Zellen läßt diese Membran zu beiden Seiten die Anlagerung eines

unterschiedlich dichten Materials erkennen, das diffus in den Extrazellularraum bzw. das Myoplasma übergeht (Abb. 19, 27a). Nur in dunklen Zellen mit glatter Oberfläche erscheint die Zellmembran als dünne osmiophile Linie, die sich kaum gegen das dichte Myoplasma abgrenzen läßt (Abb. 27b). Flach bzw. schräg angeschnittene Membranen können aus elektronenoptischen Gründen nicht als distinkte Linien zur Darstellung kommen (Abb. 22), was bei der Beschreibung von „Membranporen" oder „Membranlücken" berücksichtigt werden muß. Ein anderes charakteristisches Merkmal der Membran glatter Muskelzellen sind

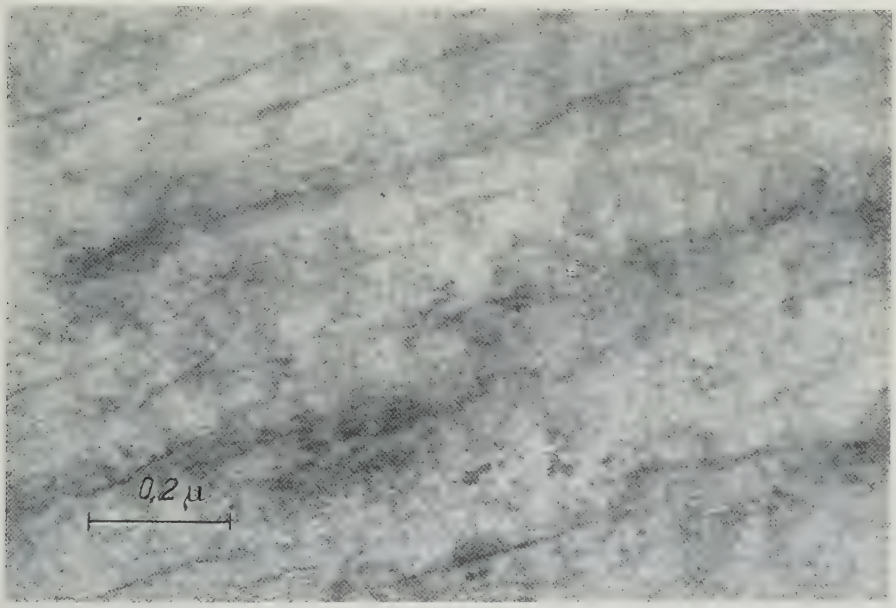


Abb. 20. Ausschnitt aus einer dunklen Muskelzelle: Lange, 40 Å dicke Filamente liegen relativ weit auseinander und sind parallel orientiert. Mit Uranylacetat nachkontrastiert. Vergr. El. opt. 30000fach. Arch. Nr. 1535/61

ähnliche Membraneinstülpungen, wie sie als pinocytotische Bläschen von Endothelzellen bekannt sind. Eine eindeutige Zunahme dieser Membranvesikulation ist in allen Zellen mit gewellter Oberfläche und ungeordneten Myofilamenten zu beobachten. Abb. 24 zeigt verschiedene Formen amöboider Zelloberflächen mit Membranvesikulation. Die Durchmesser dieser von einer Membran begrenzten Kreise sind recht unterschiedlich. Ob diese als Bläschen oder mehrfach angeschnittene Röhrchen zu deuten sind, kann vorläufig nicht entschieden werden. Die Abb. 24c scheint dafür zu sprechen, daß es sich um mehrfach angeschnittene Röhrchen handelt. Auch bei den im Myoplasma dunkler „Stachelzellen" vorkommenden Gruppen von Bläschen (Abb. 25) handelt es sich u. E. um das gleiche Drainage-System. Eine direkte Beziehung zwischen Zellmembran und Myofilamenten konnten wir nicht beobachten.

Die Ausdehnung des Extrazellularraums bzw. die Zellabstände zeigen schon innerhalb eines Muskelbündels relativ große Schwankungen. Die geringste Ausdehnung hat der Extrazellularraum zwischen annähernd parallel verlaufenden

Membranen benachbarter Zellen und zeigt hier vorwiegend basalmembranähnliche Strukturen (Abb. 26). Mit fortschreitender Ausbildung von Stachelzellen nimmt der Extrazellularraum zu. Gleichzeitig beobachtet man Längs- und Querschnitte distinkter Kollagenfibrillen, was darauf hinweist, daß auch die Substanzen des Extrazellularraums in Abhängigkeit vom zellulären Geschehen homogen oder fibrillär differenziert vorkommen.

c) Der Zellkern. Der meist zentral gelegene Zellkern zeigt ähnlich wie das Myoplasma Unterschiede der Dichte und der Oberfläche. Für die funktionelle

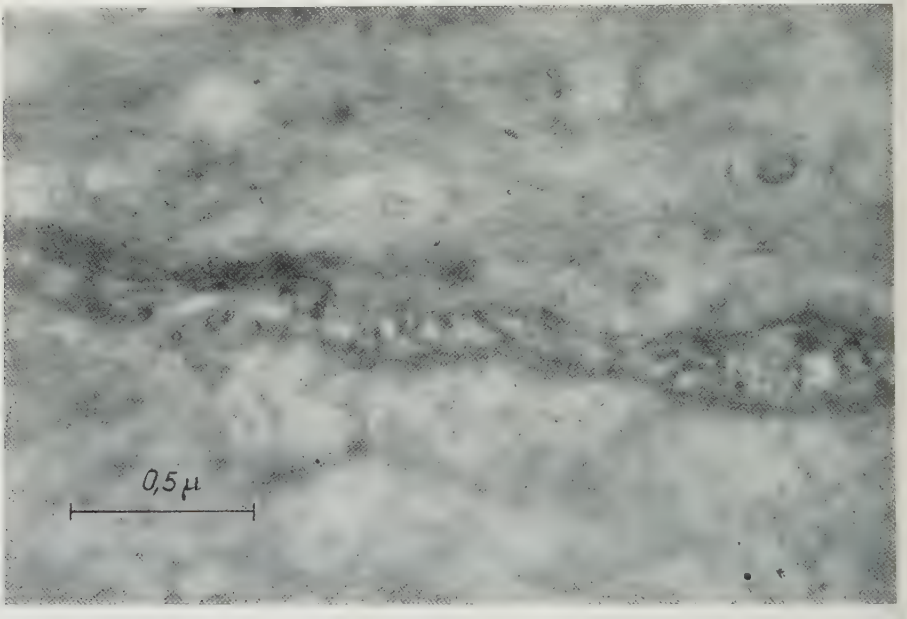


Abb. 21. Ausschnitt aus zwei hellen Muskelzellen, die locker gepackten Filamente bilden ein ungeordnetes Netzwerk. Zwischen beiden Zellen quer und schräg angeschnittene Kollagenfibrillen. Vergr. 20000fach. Arch. Nr. 1118/61

Deutung erscheint der Befund wichtig, daß in Zellen mittlerer Dichte die Längsachse von Zelle und Zellkern zusammenfällt, während in Längsschnitten von dunklen Stachelzellen die Kerne ein oder mehrere Male annähernd quer angeschnitten sind, was auf eine Verbiegung des Zellkerns hinweist. Außerdem ist die jeweilige Kernoberfläche der Zelle sehr ähnlich. Nicht so eindeutig lassen sich die Dichteunterschiede des Karyoplasmas bestimmten Zelltypen zuordnen. Nicht selten sind Gruppen von Ribosomen in Kernnähe im Myoplasma anzutreffen (Abb. 28).

d) Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum. Mitochondrien mit typischer Ultrastruktur kommen sowohl in Kernnähe als auch frei im Myoplasma vor. In langgestreckten Zellen erscheinen sie als schmale, langgestreckte Stäbchen und können bei Übersichtsvergrößerung gelegentlich mit den spindelförmigen Verdichtungen verwechselt werden. In Zellen mit amöboiden oder „stachligen" Oberflächen sieht man meist Gruppen runder Mitochondrienanschnitte; wahrscheinlich sind hier einzelne Mitochondrien infolge schraubiger Verdrehung mehr-

mals angeschnitten. Auffallend oft liegen in solchen Zellen die Mitochondrien unmittelbar an der Zelloberfläche.

Das endoplasmatische Retikulum ist in den meisten Zelltypen spärlich vorhanden und kann erst bei starker Vergrößerung vom Myoplasma unterschieden werden. Sehr stark entwickelt und vorwiegend auf die Kernpole beschränkt ist

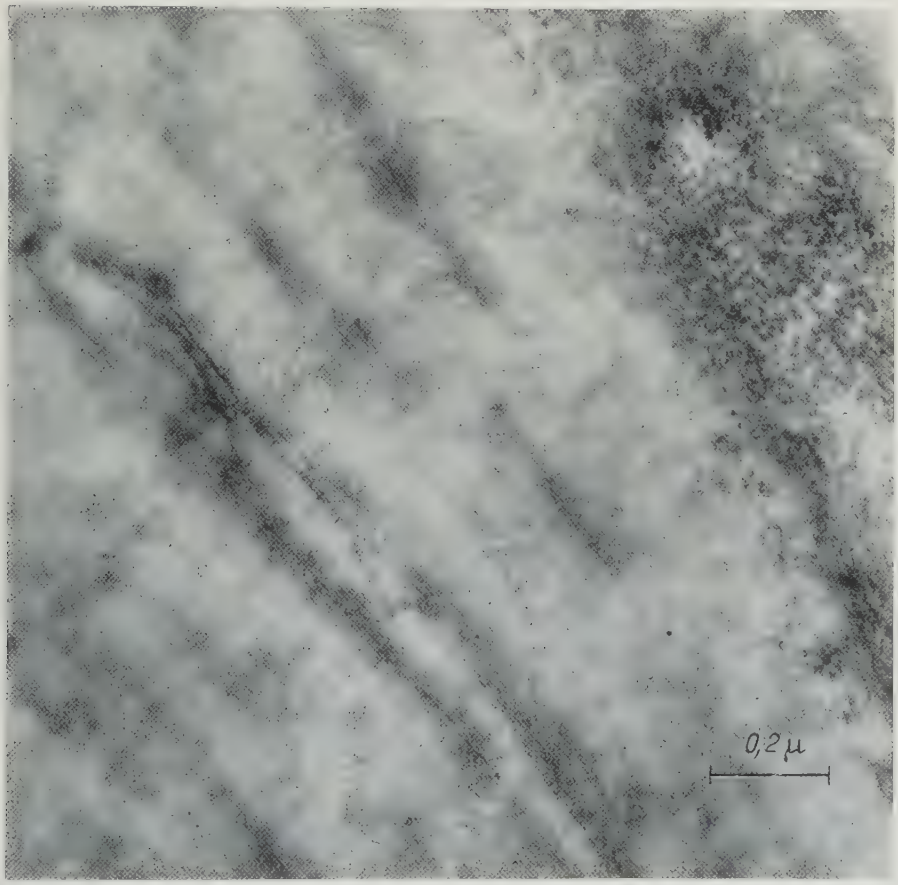


Abb. 22. Zwei helle Muskelzellen. Die spindelförmigen Verdichtungen bestehen aus einer dichten strukturlosen Substanz, in der fädige Einheiten zu erkennen sind. Vergr. 30000fach. Arch. Nr. 1532/61

es in den Uteri trächtiger Tiere. Eine Unterscheidung zwischen Bläschen des endoplasmatischen Retikulum und den sog. pinocytotischen Bläschen ist oft kaum möglich.

5. Befunde zur Innervation der glatten Muskulatur. Da wir dieses Thema an anderer Stelle ausführlich behandelt haben (Gansler 1960), sollen die Befunde hier nur zusammenfassend wiedergegeben werden. Das als Auerbachscher Plexus bekannte Nervengeflecht zwischen Ring- und Längsmuskulatur des Intestinaltraktes besteht auf Grund der elektronenmikroskopisches Befunde aus einer Vielzahl unterschiedlich großer Nerven- und Gliazellen. Im Gliaplasma ein-

gebettet liegen zahlreiche markarme Axone, die durch die sog. Mesaxone, Duplikatoren der Gliazellmembran, mit der Oberfläche der Gliazellen in Verbindung stehen. Isolierte Nervenzellen, wie sie von CAJAL (1893) als sog. interstitielle Neurone beschrieben wurden, konnten wir nirgends beobachten. Jedoch läßt sich mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen, daß die von CAJAL für Nervenzellen gehaltenen Strukturen Gliazellen sind, in deren Fortsätzen die Axonbündel aus Gangliengeflechten verlaufen. Besondere Synapsenstrukturen, vor allem

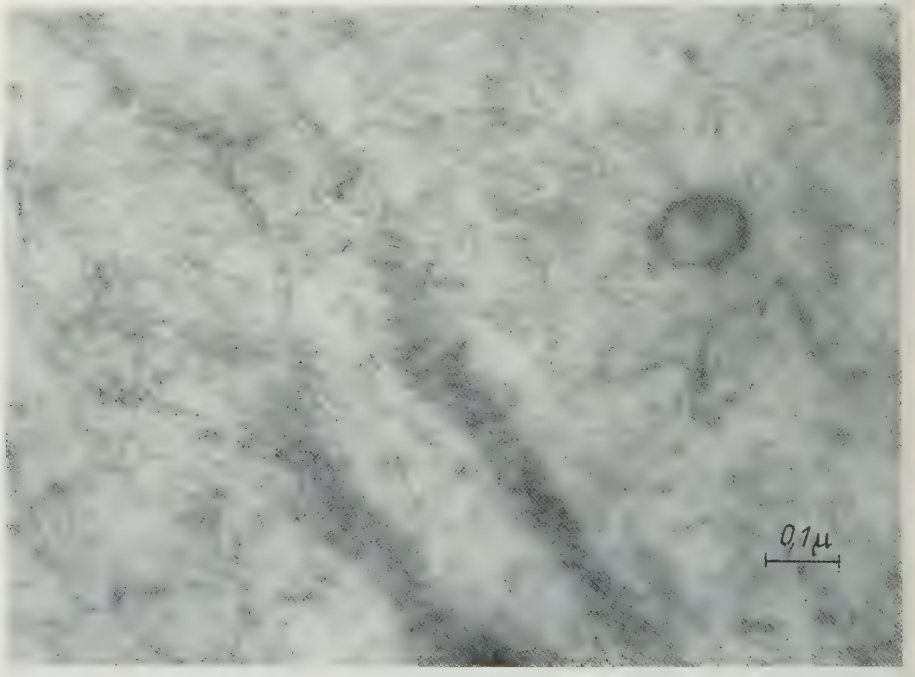


Abb. 23. Sehr lockere Netze von Myofilamenten. Die beiden spindelförmigen Verdichtungen erscheinen als Aggregate von geraden und gebogenen Filamenten. Vergr. 48000fach. Arch. Nr. 1494/61

Axone, die nicht mehr von Gliaplasma umgeben sind, konnten wir im Gegensatz zu CAESAR (1958) in keinem Falle beobachten. Vielmehr sprechen die Befunde dafür, daß eine Erregungsübertragung von Axonen auf Muskelzellen stets indirekt erfolgt, etwa im Sinne der von JABONERO (1959) postulierten „Synapse auf Distanz". Ähnliche Nervengeflechte konnten wir in der Muskelwand des Uterus bisher nicht beobachten. Nur im Parametrium fanden wir Bündel markarmer Nervenfasern mit ihren Hüllzellen.

6. Beeinflussung der Ultrastruktur glatter Muskelzellen durch präparative Faktoren. *a) Glycerinextraktion und Nachkontrastierung.* Die elektronenmikroskopische Untersuchung quergestreifter Muskeln wird heute meist nach Glycerinextraktion und Nachkontrastierung des nicht eingebetteten Gewebes mit Phosphorwolframsäure vorgenommen (HUXLEY 1957). Die Glycerinextraktion soll die Myofilamente durch Entfernen wasserlöslicher Eiweiße besser zur Darstellung bringen, sie gewissermaßen demaskieren. Entsprechend könnte man vermuten, daß in glatten Muskelzellen, die keine distinkten Myofilamente erkennen lassen,

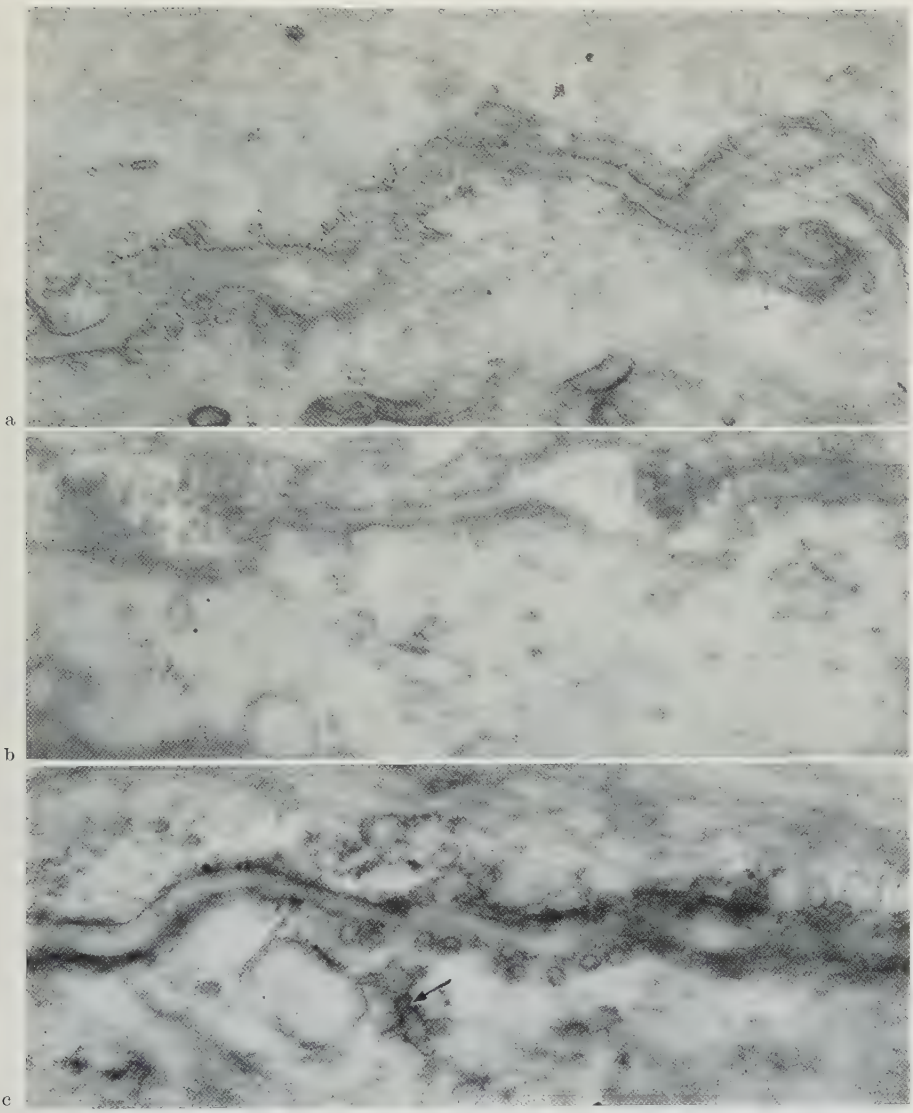


Abb. 24a—c. Verschiedene Formen amöboider Zelloberflächen mit Membranvesikulation. a Die beiden Zellmembranen verlaufen annähernd parallel. Der Extrazellularraum zeigt eine basalmembranähnliche Substanz. Vergr. 15000fach. Arch. Nr. 1603/60. b Die Zellmembranen verlaufen nicht streng parallel. An den dicht nebeneinanderliegenden Membranabschnitten ist die Substanz des Extrazellularraums strukturlos; an den weiter auseinanderliegenden Abschnitten der Zellmembranen sind quergeschnittene Kollagenfibrillen ausgebildet. Die Membranbläschen sind an zahlreichen Stellen als Oberflächeneinstülpungen zu erkennen. Vergr. 20000fach. Arch. Nr. 1114/61. c Die mit Pfeil markierte Stelle scheint dafür zu sprechen, daß es sich bei der Membranvesikulation auch um Röhrchen handeln kann. Vergr. 20000fach. Arch. Nr. 1104/61

durch Glycerinextraktion eine Demaskierung erzielt werden könnte. Daß dies nicht der Fall ist, haben wir bereits in unserer ersten Arbeit zeigen können. Im Unterschied zu nicht mit Glycerin extrahierten Geweben fehlen lediglich die homogen-dunklen (= kontrahierten) Zellen, was offenbar auf die erschlaffende Wirkung der Glycerinextraktion zurückzuführen ist.

Die Nachkontrastierung des nicht eingebetteten Gewebes mit Phosphorwolframsäure zeigt außer einer Kontrastverbesserung eine Vergröberung der

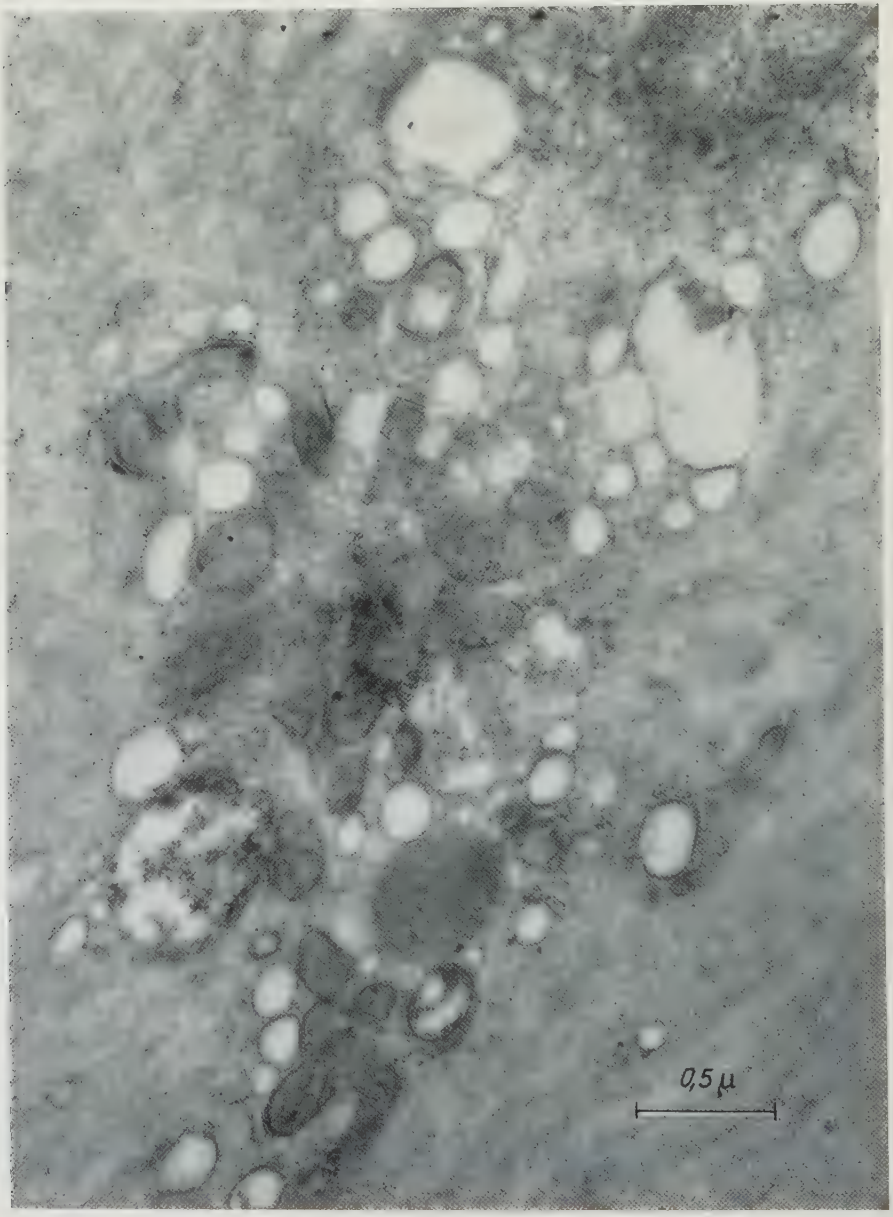


Abb. 25. Um den Kernpol gelegene Gruppe von Mitochondrien, Bläschen und Vakuolen, im Bild rechts oben flach angeschnittener Zellkern. Mit Uranylacetat nachkontrastiert. Vergr. 15000fach. Arch. Nr. 3701/60

Ultrastruktur, die wir in der ersten Arbeit mit Bildern belegt haben. Außerdem hat diese Art der Nachkontrastierung den Nachteil, daß das Gewebe härter wird

und sich infolgedessen in Butylmethacrylat schlechter schneiden läßt, als das nur mit OsO_4 fixierte Gewebe. In diesem Fall ist daher die Einbettung in Vestopal oder Araldit vorzuziehen. Diese Einbettung hat jedoch den Nachteil, daß brauchbare Schnitte nur bei sehr kleinen Schnittflächen anfallen, was die topographische Orientierung erschwert. Nach unserer Erfahrung erreicht man die besten Resultate mit OsO_4 fixiertem Gewebe, das in Butyl-Methyl-Methacrylat eingebettet und erst am Schnitt nachkontrastiert wurde. Die Nachkontrastierung am Schnitt ist allerdings nur nach Methacrylateinbettung möglich.

b) Schnittbedingte Faktoren. Für die Erfassung der Myofilamente glatter Muskelzellen spielt erwartungsgemäß die jeweilige Schnittebene eine wichtige Rolle. Da diese nur zufällig mit der Längsachse der Filamente zusammenfällt, können über die wahre Länge der Filamente keine Aussagen gemacht werden. Hingegen werden wir unabhängig von der Frage der Schnittebene entscheiden können, ob die Filamente eine Vorzugsrichtung besitzen oder nicht, da die Schnittdicke stets ein Vielfaches der Filamentdicke beträgt und auch bei sehr ungünstigem Verhältnis von Schnittebene zu Längsachse der Filamente diese stets als Filamente in Erscheinung treten.

Die bei Methacrylateinbettung stets zu beobachtende Kompression der Schnitte, die durch Xyloldämpfe weitgehend rückgängig gemacht werden kann, bewirkt keine Strukturartefakte, was sich leicht durch Drehen der Blöcke um 90^0 feststellen läßt. Anders verhält es sich bei Methacrylatblöckchen, die vor der Einbettung mit alkoholischer Phosphorwolframsäure behandelt wurden. Hier kommt es zu irreversiblen Stauchungsphänomenen während des Schneidens.

c) Fixierungsbedingte Strukturänderungen. Es ist bekannt, daß das Aufschneiden eines lebenden oder überlebenden Hohlorgans stets eine „Schrumpfung" des Muskels zur Folge hat. Diese Schrumpfung versuchten wir zu vermeiden, indem die Fixierung am intakten Hohlorgan in situ von außen und gleichzeitig per injectionem vom Lumen her vorgenommen wurde. Ein Vergleich von in situ fixierten und erst dann herausgeschnittenen Hohlorganen mit solchen, die erst nach der Herausnahme fixiert wurden, zeigt jedoch, daß die Ultrastruktur der *Zellen* durch die eine oder andere Präparationsmethode nicht beeinflußt wird, die makroskopisch sichtbare „Schrumpfung" also in erster Linie die Zell*verbände* betrifft. Auf Grund unserer Befunde an isolierten Muskelstreifen können wir annehmen, daß die Fixierung mit gepufferter isotonischer Osmiumsäure an sich nicht kontraktionsauslösend wirkt.

D. Besprechung der Befunde

I. Die Einzelzelle

Wenn wir auch annehmen können, daß sich die kontraktilen Proteine der glatten Muskelzelle nicht wesentlich von denen der quergestreiften unterscheiden (Snellmann und Tenow 1954, Needham und Cawkwell 1956), so ist es doch vorläufig noch nicht möglich, die Myofilamente bzw. die Bestandteile des Myoplasmas biochemisch zu definieren. Mit Sicherheit kann angenommen werden, daß die Dichte-Unterschiede des Myoplasmas auf Flüssigkeitsverschiebungen zwischen Intra- und Extrazellularraum beruhen und daß die „Kontraktion" der Einzelzelle als Entquellung aufzufassen ist. Schwieriger ist es, zu der Frage

Stellung zu nehmen, ob diese Quellungsphänomene die Filamente oder das Sarkoplasma oder beide zugleich betreffen. Da die Durchmesser der Filamente keine signifikanten Unterschiede zeigen, wohl aber die Abstände zwischen den Filamenten stark variieren, könnte zunächst vermutet werden, daß nur das Sarkoplasma bzw. das interfilamentäre Material für Hydratation bzw. Dehydratation des Myoplasmas eine Rolle spielt. Berücksichtigt man aber, daß die

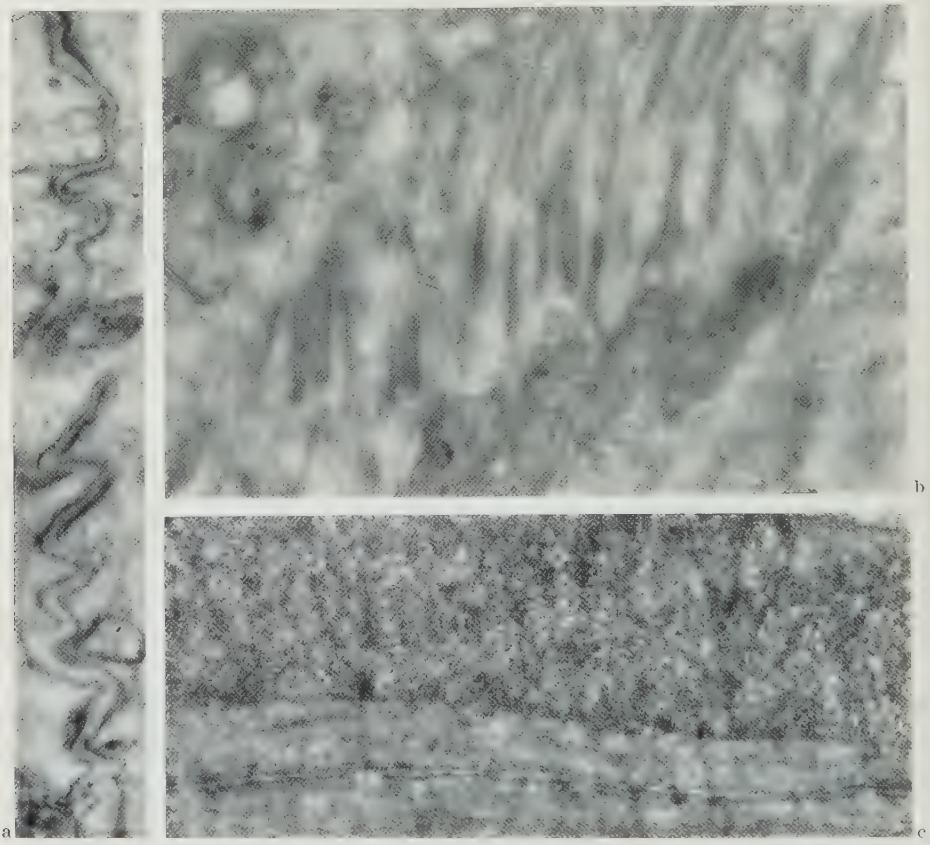


Abb. 26. a u. b. Übergang von ineinander verzahnten Zellen (a) zu dichteren Stachelzellen. c Glatte Oberflächen zweier dunkler sehr dicht nebeneinanderliegender Muskelzellen. Vergr. a 8000fach. Arch. Nr. 1010/60. Vergr. b 16000fach. Arch. Nr. 1313/58. Vergr. c 8000fach. Arch. Nr. 1337/58

sichtbaren Filamente in dunklen Zellen auch sehr weit auseinanderliegen (Abb. 18) und daß das Myoplasma in bestimmten Zelltypen annähernd homogen erscheint, so muß daran gedacht werden, daß auch die Filamente an den Quellungsvorgängen beteiligt sind. Mit der von SZENT-GYÖRGY (1956) entwickelten Vorstellung, daß der Myosinkomplex aus Schwarmformationen von sehr kleinen Molekülen, Protomyosinen, besteht, die durch sich abstoßende Kräfte locker (= Erschlaffung), durch sich anziehende Kräfte dicht gepackt sind, lassen sich die elektronenmikroskopischen Befunde befriedigend erklären: Myofilamente wären nur dann zu erwarten, wenn die Gruppen von Protomyosinmolekülen als diskontinuierliche, aber dichte Aggregate vorliegen. Da die Protomyosinmoleküle als solche infolge zu geringer Dichte wahrscheinlich nicht mehr erfaßt werden können, würde die

Abnahme oder das völlige Fehlen von Filamenten in hellen Zellen auf einer für das Elektronenmikroskop zu lockeren Anordnung solcher Schwarmformationen beruhen. Umgekehrt würden diese in dunklen Muskelzellen infolge sehr dichter und isotroper Packung elektronenmikroskopisch mehr oder weniger homogen erscheinen. Ein anderer Beweis für die Beteiligung der Filamente an den Quellungsvorgängen ist der Befund, daß in bestimmten Zelltypen auch nach Glycerinextraktion keine Filamente demaskiert werden können.

Auch die punkt- oder spindelförmigen Verdichtungen bestehen aus Filamentaggregaten, die in eine dichtere Substanz eingebettet sind. Vielleicht handelt es sich hierbei um eine inaktive Form des Actomyosinkomplexes, da sie in Uteri trächtiger Tiere eindeutig vermehrt sind und während der Austreibungsperiode

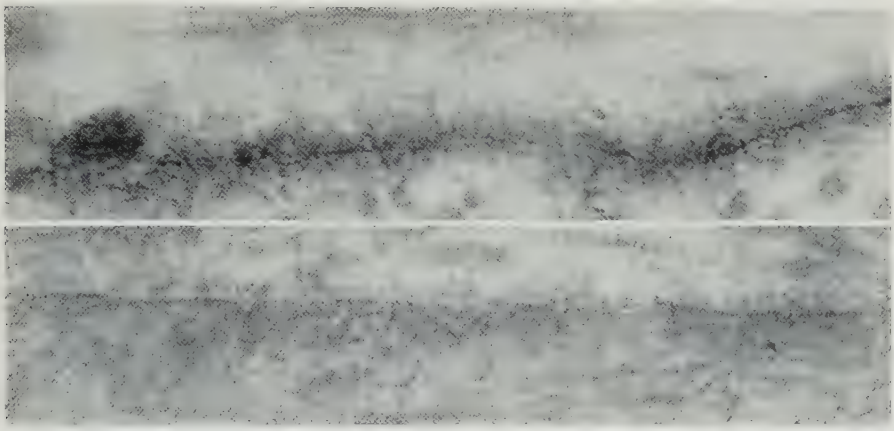


Abb. 27a u. b. Verschiedene Formen der Zellmembran. In a ist der Membran zu beiden Seiten eine dichtere Substanz angelagert, während sie in b als schmale osmiophile Linie von gleicher Dichte wie das Myoplasma erscheint. Vergr. a 30000fach. Arch. Nr. 1535/61. Vergr. b 26000fach Arch. Nr. 1506/61

fast völlig verschwinden. Auch das Fehlen der Verdichtungen in hellen und dunklen Zellen kann in diesem Sinne gedeutet werden, da Aktin während der Kontraktion zur globulären Form depolymerisiert wird.

Man könnte also die kontraktile Substanz als kolloidale „Lösung" auffassen, deren funktionelle Leistung im wesentlichen als Sol-Gel-Transformation zu beschreiben wäre. Für die Flüssigkeitsverschiebung dürften die Bläschen oder Röhrchen, die mit der Zelloberfläche in Verbindung stehen, als zelluläres „Drainagesystem" eine Rolle spielen. Die unterschiedliche Zahl dieser Bläschen in den verschiedenen Zelltypen läßt vermuten, daß sie ständig neu gebildet werden. Es müssen also die molekularen Bausteine der die Bläschen begrenzenden Membranen stets im Myoplasma vorhanden sein. Kommt es nun zu einer Dehydratation der kontraktilen Proteine, so entstehen an zahlreichen Stellen im Myoplasma Grenzflächen, die das Entstehen von Membranen aus vorhandenen Bausteinen begünstigen.

Die kontraktile Substanz der glatten Muskulatur ist morphologisch labiler als die der quergestreiften. Eine deutliche Trennung von Filamenten und Sarkoplasma ist nur in bestimmten Zelltypen möglich. Von dem jeweiligen Dissoziationsgrad der kleinsten molekularen Einheiten hängt es ab, ob Filamente elektronenmikroskopisch sichtbar werden. Das Fehlen einer Vorzugsrichtung

in hellen und dunklen Muskelzellen könnte im Sinne eines während der Erregung, Kontraktion und Erschlaffung ablaufenden zyklischen Prozesses gedeutet werden: Während der Erregung kommt es zunächst zu einer Dissoziation und dem Verlust einer Vorzugsrichtung der Myofilamente. Dem würde die Assoziation ungeordneter Filamente folgen, verbunden mit Entquellung und Membranvesikulation. Die Erschlaffungsphase wäre charakterisiert durch die Wiederherstellung geordneter Filamente und Verdichtungen. Zwar können wir morphologisch nicht mit Sicherheit die hellen homogenen Zellen der initialen Erregung zuordnen; da aber

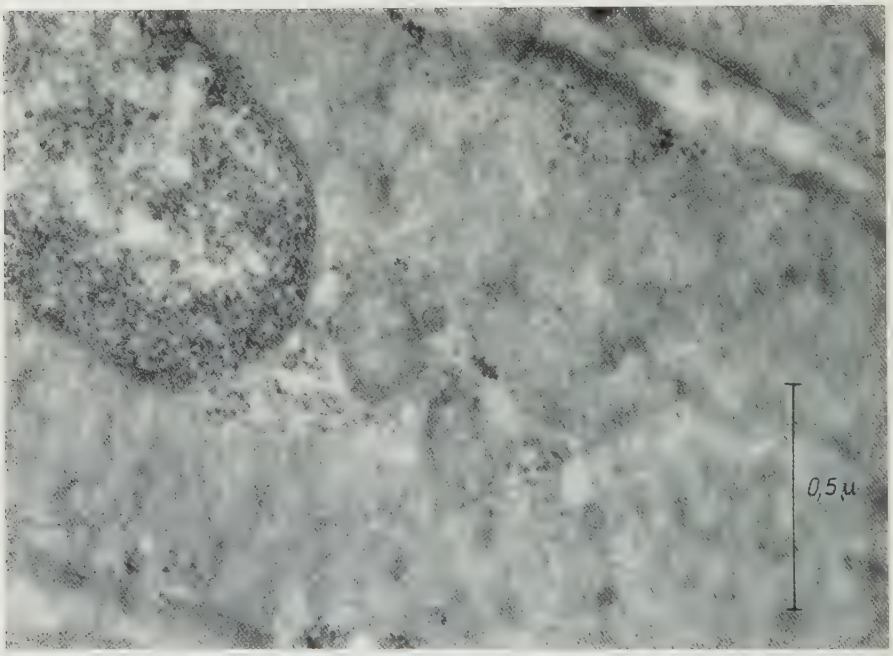


Abb. 28. Zellkern einer dunklen Muskelzelle; an einer Stelle ist die doppelte Kernmembran gut zu erkennen. Gruppen von Ribosomen liegen in Kernnähe frei im Myoplasma. Vergr. 30000fach. Arch. Nr. 1536/61

auf Grund physiologischer Arbeiten (Lit. bei DUBUISSON 1954) eine initiale Erschlaffungs- bzw. Quellungsphase angenommen werden kann, liegt es nahe, die hellen Zellen hiermit in Verbindung zu bringen.

Die Intensität der Entquellung, die von Elektrolyt- und ATP-Konzentration abhängig sein dürfte, bestimmt die effektive Leistung der Einzelzelle, wie wir auf Grund von Versuchen an isolierten Muskelstreifen annehmen können. Für die rhythmische Aktivität scheint außerdem der Wechsel zwischen isotrop und anisotrop angeordneten Filamenten eine Rolle zu spielen. Auch die mechanischen Eigenschaften des Myoplasmas bzw. Plastizität und Elastizität scheinen hiervon beeinflußt zu werden. Ob die Formveränderungen der Zellkerne aktiv oder passiv erfolgen, können wir noch nicht sagen. Auf jeden Fall bewirkt die Knickung oder Verbiegung des Zellkerns eine Verkürzung der Zelle bzw. des Zellverbandes, die für die Gesamtverkürzung eines Muskels mehr ins Gewicht fallen dürfte als die Entquellung. Besonders ausgeprägt sind Kernveränderungen an Muskelzellen aus FH-stimulierten Uteri. Die in solchen Zellen spiralig ver-

drehten oder segmentierten Kerne sehen im Lichtmikroskop ähnlich aus wie neutrophile Leukocyten. Über die Beziehung solcher Zellformen zu den nach langzeitiger FH-Wirkung ebenfalls auftretenden Zellen mit eosinophilen Granula soll an anderer Stelle berichtet werden.

II. Die Muskelbündel

Der von M. Heidenhain (1899, 1907) geprägte Begriff der *Encapsis* eignet sich besonders gut zur Besprechung der in verschiedenen Dimensionen erhobenen Befunde an glatten Muskeln. Er besagt, daß genetische Systeme durch typische Übereinanderschichtungen in verschiedenen Größenordnungen charakterisiert sind. So können alle glattmuskulären Hohlorgane auf Grund ihres Bauprinzips in immer kleinere Einheiten unterteilt werden: Die Muskelwand besteht aus einzelnen Schichten vorwiegend longitudinal oder vorwiegend zirkulär verlaufender „Faser"-Systeme, die in einzelne Bündel (oder Segmente nach Goerttler) gegliedert sind. Die Bündel bauen sich aus Zellen auf und diese bestehen aus den von Heidenhain „Molekularfibrillen" genannten Einheiten, die erst elektronenmikroskopisch als Myofilamente dargestellt werden können.

Die Aufgabe eines Hohlmuskels besteht darin, den von ihm umschlossenen Inhalt aufzunehmen, zu halten, zu bewegen und schließlich in einer Richtung weiterzuleiten. Berücksichtigt man die Tatsache, daß an rhythmisch tätigen Hohlorganen stets enge und weite Abschnitte miteinander abwechseln bzw. die Ausbildung eines Kontraktionsringes stets von einer Erweiterung benachbarter Abschnitte begleitet ist, so kann die rhythmische Tätigkeit glatter Muskeln gewissermaßen als Pendelmechanismus um eine mittlere Gleichgewichtslage (im untätigen, bzw. ruhig gestellten Muskel) aufgefaßt werden. Für die Haltefunktion spielen Spannung und Tonus eine wesentliche Rolle, während für die Bewegung und die Austreibung des Inhalts eine Verkürzung des Muskels bzw. Verengerung des Hohlraums hinzukommen muß. Spannung bzw. Tonus können primär als zelluläre Leistungen aufgefaßt werden; für die Enger- bzw. Weiterstellung bzw. Verkürzung und Verlängerung des Gesamtmuskels spielt außerdem der Verstellmechanismus der Zellen und Muskelbündel eine Rolle. Für das Ingangkommen solcher Verschiebungen von Muskelbündeln sind sicher der vom Lumen her wirkende Innendruck und nervöse Impulse von Bedeutung. Die Frage, ob für die gegen einen Innendruck erfolgende Verstellung der Muskelbündel das extrazelluläre Scherengitter oder die Muskelzellen primär eine Rolle spielen, wird vom Morphologen bei funktionellen Einheiten aus Ring- und Längsmuskulatur schwer zu beantworten sein. Einfacher liegen die Verhältnisse dort, wo die Ringmuskulatur nicht von Längsmuskulatur bedeckt ist, wie es z. B. am Colon und Caecum des Meerschweinchens der Fall ist. Der Befund, daß die Motilität dieser von Längsmuskulatur freien Muskelbündel mit einer charakteristischen Auf- und Abbewegung der Muskelwand einhergeht (s. Abb. 2), kann nicht allein mit dem von Goerttler beschriebenen Scherengitter-Mechanismus erklärt werden, vielmehr muß hierbei auch eine aktive Verformung der Zellen und Zellverbände stattfinden. Das extrazelluläre Fasergitter würde demnach als lockeres dreidimensionales Gerüst die jeweiligen Baueinheiten des Muskels so zusammenhalten, daß diese bei Form- oder Volumänderungen in begrenzten Bereichen verschieblich sind.

Die von GOERTTLER (1932) eingehend diskutierte Frage, ob die Muskelbündel der Ringmuskulatur des Darms geschlossene Kreise bilden oder schraubenförmig angeordnet sind, ist schwer zu beantworten, da auch das vorsichtige Zerzupfen von Ringmuskulatur zu keinen eindeutigen Ergebnissen führt. Die Annahme CAREYs (1920) — zu der er auf Grund entwicklungsmechanischer Vorstellungen kommt —, daß sowohl die Längs- als auch die Ringmuskulatur in Schraubenform — mit verschiedener Ganghöhe — gebaut ist, ist meines Erachtens sehr überzeugend. Nach CAREY soll das Epithelrohr in Schraubentouren schneller wachsen als die Muskelschicht, wodurch diese mechanisch gedehnt wird und die Muskelzellen eine Orientierung in Schraubenrichtung erfahren.

Für Form und Ausmaß der makroskopisch sichtbaren Bewegungsformen glattmuskulärer Hohlorgane würde also die jeweils charakteristische Anordnung der Muskelbündel zu größeren Systemen verantwortlich sein. Besteht die Muskelwand überall aus longitudinal und zirkulär verlaufenden Schichten, so resultiert eine koordinierte Leistung verschiedener Systeme. Ist die Längsmuskulatur auf kleine Bereiche reduziert, so steht die Aktion der Ringmuskulatur als Auf- und Abbewegung im Vordergrund.

Nun sind auch die einzelnen longitudinal oder zirkulär angeordneten Muskelsysteme aus kleinen Einheiten, den Muskelbündeln zusammengesetzt. Sie treten vor allem bei der stärker ausgebildeten Ringmuskulatur in Erscheinung (s. Abb. 1). Ein Muskelbündel besteht aus einer Vielzahl nicht streng parallel angeordneter Muskelzellen, die in ähnlicher Weise gegeneinander verstellbar sind, wie die Muskelbündel. Daß die Zellindividuen dennoch einen festen Zellverband bilden, liegt offenbar an der Beschaffenheit des Extrazellular-Materials. Dieses besteht aus der sog. Grundsubstanz und aus sich überkreuzenden Kollagenfibrillen. Beide Formen lassen sich nicht scharf gegeneinander abgrenzen und es muß angenommen werden, daß die extrazellulären Substanzen sowohl homogen (Basalmembran oder Grundsubstanz) als auch fibrillär differenziert vorliegen können. Für die Ausbildung der einen oder anderen Form scheint die Flüssigkeits- und Ionenverschiebung zwischen Intra- und Extrazellularraum eine Rolle zu spielen. Handelt es sich bei den sog. Basalmembranen um eine mehr oder weniger visköse kolloidale Substanz, so ist wahrscheinlich, daß diese die Muskelzellen quasi fest miteinander verbindet. Unterstützt wird diese „Festigkeit" in bestimmten Phasen durch die ineinander verzahnten Oberflächen der Muskelzellen. Wird der Abstand zwischen den Zellen größer, so scheint gleichzeitig eine fibrilläre Differenzierung der extrazellulären Substanzen zu erfolgen; diese könnte in gewissen Grenzen eine Verschieblichkeit bzw. Schrägstellung der Muskelzellen gegeneinander ermöglichen.

Zusammenfassung

Die licht- und elektronenmikroskopischen Befunde an glatten Muskeln verschiedener Herkunft lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. An in situ fixierten Muskeln kommen meist helle und dunkle Muskelzellen nebeneinander vor.

2. In Anlehnung an die Befunde an isolierten Muskelstreifen, die in definierten Funktionszuständen fixiert wurden, kann angenommen werden, daß die hellen und dunklen Zellen während der aktiven Phase des Kontraktionszyklus vorkommen und die Zellen mittlerer Dichte dem Ruhestadium zuzuordnen sind.

3. Die Dichte- bzw. Kontrastunterschiede des Myoplasmas werden als Quellungs- und Entquellungsprozesse der kontraktilen Substanz aufgefaßt. Wahrscheinlich liegt die kontraktile Substanz der glatten Muskelzelle in einer ähnlich labilen Form vor, wie aus Muskeln extrahierte Acto-Myosin-Lösungen. Die etwa 40 Å dicken Myofilamente besitzen in der erschlafften Zelle eine Vorzugsrichtung parallel zur Längsachse der Zelle. Die in solchen Zellen außerdem vorkommenden spindelförmigen Verdichtungen könnten als inaktiver Actomyosinkomplex gedeutet werden. Während des Kontraktionszyklus kommt es wahrscheinlich zunächst zu einer dreidimensionalen Assoziation der Myofilamente, die nun keine Vorzugsrichtung mehr erkennen lassen. Hiermit ist eine Faltung der Zelloberflächen dieser hellen, homogenen Zellen verbunden, wodurch diese innerhalb des Zellverbandes ineinander verzahnt sind. Dann beginnt die Dehydratation der kontraktilen Substanz, die über neu sich bildende Bläschen oder Röhrchen in den Extrazellularraum erfolgt. Die Zelloberflächen werden mit fortschreitender Entquellung „stachelförmig", die Abstände zwischen den Zellen nehmen zu. Die Erschlaffungsphase ist charakterisiert durch das Wiederauftreten parallel orientierter Filamente und rückläufige Flüssigkeitsverschiebung.

4. Für die makroskopisch sichtbare Verkürzung glatter Muskeln spielt außer den im Molekularbereich sich abspielenden Vorgängen der Einzelzellen auch die Anordnung der Muskelzellen zueinander eine Rolle. Dunkle Stachelzellen sind nicht langgestreckt, sondern geknickt oder verbogen. Ob die schraubenartig verdrehten Kerne dieser Zellen aktiv oder passiv zustande kommen, kann nicht mit Sicherheit entschieden werden. Da auch das Karyoplasma in den verschiedenen Zelltypen Dichteunterschiede zeigt, ist an eine Mitbeteiligung des Zellkerns am Kontraktionszyklus zu denken. Für den Gesamtmuskel eines Hohlorgans spielt außerdem der von Goerttler beschriebene Verstellmechanismus der Muskelbündel eine Rolle.

5. Für die effektive Leistung eines Muskels dürfte sowohl der Grad der Entquellung der *Einzelzelle* wie auch die Summe der Zellen in der *gleichen* Funktionsphase eine Rolle spielen.

Literatur

Bailey, K.: Structure Proteins. II. Muscle. In: The Proteins, vol. II/B, p. 951—1051. New York: Academic Press 1954.

Barfurth, D.: Über Zellbrücken glatter Muskelfasern. Arch. mikr. Anat. **38**, 38—51 (1891).

Benninghoff, A.: Über die Beziehungen zwischen elastischem Gewebe und glatter Muskulatur in der Arterienwand und ihre funktionelle Bedeutung. Z. Zellforsch. **6** (1927).

Bohemann, H.: Interzellularbrücken und Safträume der glatten Muskulatur. Anat. Anz. **10**, 305—315 (1895).

Caesar, R.: Elektronenmikroskopische Beobachtungen zum Verhalten der marklosen Nervenfasern im glatten Muskelgewebe. Verh. der Anat. Ges. 1958. Anat. Anz. **158**, Erg.-Bd., 90—100 (1958).

Cajal, R.: Los ganglios y plexos nerviosos del intestino de los mamiferos. Madrid 1893.

Carey, E. J.: Studies on the dynamics of histogenesis. Growth motive force as a dynamic stimulus of the genesis of muscular and skeletal tissues. Anat. Rec. **19**, 4 (1920).

Caulfield, J. B.: Effects of varying the vehicle for OsO_4 in tissues fixation. J. biophys. biochem. Cytol. **3**, 827 (1957).

Dubuisson, M.: Muscular contraction. Springfield Ill.: Ch. C. Thomas 1954.

Fischer, E.: Vertebrate smooth muscle. Physiol. Rev. **24**, 467—490 (1944).

Froboese, H.: Die Neubildung von Muskelzellen während der Tragzeit in der Gebärmutterwand der Hausmaus. Z. mikr.-anat. Forsch. **37**, 17—48 (1935).

Gansler, H.: Über ringkernige Gewebsleukocyten im Genitaltrakt der Ratte und ihren Zusammenhang mit weiblichen Sexualhormonen. Virchows Arch. path. Anat. **325**, 90—97 (1954).
— Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Uterusmuskel der Ratte unter Follikelhormonwirkung. Virchows Arch. path. Anat. **329**, 235—244 (1956).
— Phasenkontrast- und Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Morphologie und Funktion der glatten Muskulatur. Z. Zellforsch. **52**, 60—92 (1960).
— Phasenkontrast- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Innervation der glatten Muskulatur. Acta neuroveg. (Wien) **22**, H. 3 (1961).
Goerttler, K.: Die Architektur der Muskelwand des menschlichen Uterus und ihre funktionelle Bedeutung. Morph. Jb. **65**, 45—128 (1931).
— Der konstruktive Bau der menschlichen Darmwand. Morph. Jb. **69**, 329—379 (1932).
Greven, K.: Die Mechanik der glatten Muskulatur der Wirbeltiere. Klin. Wschr. **29**, 683—693 (1951).
Grützner, P.: Die glatten Muskeln. Ergebn. Physiol., II. Abt. **3**, 16—88 (1904).
Häggqvist, G.: Das glatte Muskelgewebe. In Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, herausgeg. von W. v. Möllendorff, Bd. II/3. Berlin: Springer 1932, und Erg.-Bd. II/4. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956.
Heidenhain, M.: Beiträge zur Aufklärung des wahren Wesens der faserförmigen Differenzierungen. Anat. Anz. **16**, 97—131 (1899).
— Die Struktur der kontraktilen Materie. Ergebn. Anat. Entwickl.-Gesch. **10**, 115—214 (1900).
— Plasma und Zelle. I. Abt. Allgemeine Anatomie der lebendigen Masse. Jena 1907
Henneberg, B.: Das Bindegewebe in der glatten Muskulatur und die sogenannten Interzellularbrücken. Anat. H., I. Abt. **14**, 301—314 (1900).
Hirsch, S.: Über die morphologischen Merkmale der Vasokonstriktion beim Menschen. Zugleich ein Beitrag zum Problem der glatten Muskelfaser. Acta med. scand. **152**, 379—390 (1955).
Huxley, H. E.: The double array of filaments in cross-striated muscle. J. biophys. biochem. Cytol. **3**, 631—648 (1957).
Jabonero, V.: Die plexiforme Synapse auf Distanz und die Bedeutung der sogenannten interkalären Zellen. Acta neuroveg. (Wien) **19**, 276—302 (1959).
Koelliker, A. v.: Beiträge zur Kenntnis der glatten Muskeln. Z. wiss. Zool. **1** (1849).
McGill, C.: Structure of smooth muscle in the resting and in the contracted condition. Amer. J. Anat. **9**, 493—545 (1909).
Meigs, E. B.: Microscopic studies of living smooth muscle. Amer. J. Physiol. **29**, 317—329 (1912).
Needham, D. M., and C. M. Cawkwell: Some properties of the actomyosin like protein of the uterus. Biochem. J. **63**, 337—344 (1956).
Roskin, G.: Über die Struktur der glatten Muskelzelle. Z. Zellforsch. **24**, 585—613 (1936).
Shoenberg, C. F.: An electron microscopy study of smooth muscle in the pregnant uterus of the rabbit. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 609—614 (1958).
Snellmann, O., and M. Tenow: A contractile element containing tropomyosin (Actotropomyosin). Biochim. biophys. Acta **13**, 199—208 (1954).
Spanner, R.: Die Drosselklappe der veno-venösen Anastomose und ihre Bedeutung für den Abkürzungskreislauf im porto-cavalen System des Vogels; zugleich ein Beitrag zur Kenntnis der epitheloiden Zellen. Z. Anat. Entwickl.-Gesch. **109**, 443—492 (1939).
Staubesand, J.: Über den Wandbau der arterio-venösen Anastomosen und die Bedeutung der epitheloiden Zellen. Ärztl. Forsch. **3**, 78—86 (1949).
Stieve, H.: Muskulatur und Bindegewebe in der Wand der menschlichen Gebärmutter außerhalb und während der Schwangerschaft, während der Geburt und des Wochenbettes. Z. mikr.-anat. Forsch. **17**, 371—518 (1929).
Szent-György: Chemistry of muscular contraction. New York: Academic Press 1951.
— Bioenergetics. Science **124**, 873—875 (1956).

Priv.-Doz. Dr. Hedi Gansler,
Elektronenmikroskopische Abteilung der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes Homburg

Aufnahmebedingungen

I. Sachliche Anforderungen

1. Der Inhalt der Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören.

2. Die Arbeit muß wissenschaftlich wertvoll sein und Neues bringen. Bloße Bestätigungen bereits anerkannter Befunde können, wenn überhaupt, nur in kürzester Form aufgenommen werden. Dasselbe gilt von Versuchen und Beobachtungen, die ein positives Resultat nicht ergeben haben. Arbeiten, rein referierenden Inhalts werden abgelehnt, vorläufige Mitteilungen nur ausnahmsweise aufgenommen. Polemiken sind zu vermeiden, kurze Richtigstellung der Tatbestände ist zulässig. Aufsätze spekulativen Inhalts sind nur dann geeignet, wenn sie durch neue Gesichtspunkte die Forschung anregen.

II. Formelle Anforderungen

1. Das Manuskript muß leicht leserlich (möglichst in Maschinenschrift) geschrieben sein. Die Abbildungsvorlagen sind auf besonderen Blättern beizufügen. Diktierte Arbeiten bedürfen der stilistischen Durcharbeitung zwecks Vermeidung von weitschweifiger und unsorgfältiger Darstellung. Absätze sind nur zulässig, wenn mit ihnen ein neuer Gedankengang beginnt.

2. Die Arbeiten müssen *kurz* und stilistisch einwandfrei geschrieben sein. Ausführliche historische Einleitungen sind zu vermeiden. Die Fragestellung kann durch wenige Sätze klargelegt werden. Der Anschluß an frühere Behandlungen des Themas ist durch Hinweis auf die letzten Literaturzusammenstellungen (in Monographien, „Ergebnissen", Handbüchern) herzustellen.

3. Der Weg, auf dem die Resultate gewonnen wurden, muß klar erkennbar sein; jedoch hat eine ausführliche Darstellung der Methodik nur dann Wert, wenn sie wesentlich Neues enthält.

4. Jeder Arbeit ist eine kurze Zusammenfassung (höchstens 1 Seite) der wesentlichen Ergebnisse anzufügen, die in einer der Kongreßsprachen abgefaßt sein kann.

5. Von jeder Versuchsart bzw. jedem Tatsachenbestand ist in der Regel nur *ein* Protokoll im Telegrammstil als Beispiel in knappster Form mitzuteilen. Das übrige Beweismaterial kann im Text oder, wenn dies nicht zu umgehen ist, in Tabellenform gebracht werden; dabei müssen aber umfangreiche tabellarische Zusammenstellungen unbedingt vermieden werden. Es wird empfohlen, durch eine Fußnote daraufhinzuweisen, in welchem Institut das gesamte Beweismaterial eingesehen oder angefordert werden kann.

6. Die *Abbildungen* sind auf das unbedingt Notwendige zu beschränken. Kurven, Diagramme usw., die nur zur Illustration von Befunden dienen und ohne weiteres im Text beschrieben werden können, werden zurückgewiesen. Knappe, klare Abbildungsunterschriften (Legenden) erübrigen nochmalige Beschreibung im Text. Sie sind getrennt von den Abbildungen dem Manuskript im Anschluß an das Literaturverzeichnis beizufügen. Unzulässig ist die *doppelte* Darstellung in Abbildung *und* Kurve. Bereits veröffentlichte Abbildungen können nicht wiederholt werden. Ausnahmen hiervon sind nur in besonders begründeten Fällen möglich. *Farbige* Bilder können in der Regel keine Aufnahme finden. Für Kurven oder Schwarzweißzeichnungen, die als Strichätzung reproduziert werden können, genügt die Ablieferung sauberer, klarer Skizzen, die vom Verlag umgezeichnet werden. Bei Halbtonbildern (Photos, Mikrophotos, Halbtonzeichnungen) sind saubere, scharfe und tonwertreiche Originalvorlagen (Hochglanzabzüge von Originalphotographien) notwendig. Besondere Wünsche des Autors hinsichtlich des linearen Verkleinerungs- und Vergrößerungsmaßstabes der Vorlagen sollen vermerkt werden.

Die *Beschriftung* der Abbildungen mit Buchstaben oder Ziffern erfolgt durch den Verlag. Die Hinweise hierfür sollen keinesfalls in der Abbildung selbst, sondern auf einem darüberliegenden transparenten Deckblatt angegeben werden. Dort sind auch Abstriche oder gewünschte Bildausschnitte zu bezeichnen. Hinweispfeile oder -linien sind ebenfalls auf dem Deckblatt anzubringen, wobei die Endpunkte durch Einstich mit einer feinen Nadel auf der darunterliegenden Originalvorlage fixiert werden sollen. Es empfiehlt sich ferner, auf dem Deckblatt wichtige Abbildungspartien zu kennzeichnen, damit die Kunstanstalt bei der Ätzung ihr besonderes Augenmerk darauf richten kann.

7. Literaturangaben sollen Autorennamen, vollständigen Titel der Arbeit, Zeitschrift, Band- und Seitenzahl sowie Jahreszahl umfassen [z.B. Böke, W.: Untersuchungen des Linsenepithels mit dem Phasenkontrastmikroskop. Z. Zellforsch. **38**, 428—454 (1953)]. Die Literaturangaben sind am Schluß der Arbeit nach den Autorennamen alphabetisch anzuordnen und nicht zu numerieren. Werden mehrere Arbeiten des gleichen Autors zitiert, so ist an der betreffenden Stelle im Text eine in Klammern gesetzte 1, 2 bzw. 3 hinter dem Autorennamen einzufügen. Im Literaturverzeichnis steht diese Zahl, ebenfalls in Klammern gesetzt, vor der betreffenden Arbeit. Bücher müssen mit vollem Titel, Auflage, Ort, Verlag und Jahr zitiert werden.

8. Methodik, Protokolle und weniger wichtige Teile des Textes sind für *Kleindruck* vorzumerken. Die Lesbarkeit des Wesentlichen wird hierdurch gehoben.

9. Doppeltitel sind aus bibliographischen Gründen unerwünscht. Das gilt insbesondere, wenn die Autoren in Ober- und Untertitel einer Arbeit nicht die gleichen sind.

10. An *Dissertationen*, soweit deren Aufnahme überhaupt zulässig erscheint, werden nach Form und Inhalt dieselben Anforderungen gestellt wie an andere Arbeiten. Danksagungen an Institutsleiter, Dozenten usw. werden nicht abgedruckt. Zulässig sind einzeilige Fußnoten mit der Mitteilung, wer die Arbeit angeregt und geleitet oder wer die Mittel dazu gegeben hat. *Festschriften* und *Monographien* gehören nicht in den Rahmen einer Zeitschrift.

Chirurgie der Milz

Von Privatdozent Dr. med. HANS-JOACHIM STREICHER,
Oberarzt der Chirurgischen Universitätsklinik Marburg a. d. Lahn

Mit 91 Abbildungen, davon 4 farbigen. VIII, 241 Seiten Gr.-8°. 1961. Ganzleinen DM 78,—

INHALTSÜBERSICHT

Allgemeines, Anatomie, Physiologie: Einleitende Betrachtungen zur Milzchirurgie. Geschichtliches. Anatomie. Physiologie und pathologische Physiologie · Milzkrankheiten: Allgemeine Diagnostik. Mißbildungen und Lageveränderungen. Milzverletzungen. Infektmilz. Splenomegalien bei Blutkrankheiten. Splenomegalien bei Erkrankungen des reticuloendothelialen Systems. Die hepatolienalen Krankheiten. Gefäßbedingte Milzerkrankungen. Amyloidmilz. Milzcysten. Echinokokkose. Geschwülste · Operationen an Milz und Milzstiel: Chirurgische Therapie. Operationen am Milzstiel. Der Splenektomierte · Literatur- und Sachverzeichnis.

ZUR INFORMATION

Kaum ein anderes Gebiet chirurgischer Tätigkeit ist mit den Arbeits- und Forschungsgebieten benachbarter Disziplinen, insbesondere der inneren Medizin, aber auch der Physiologie, so eng verknüpft wie die Milzchirurgie. Daß der Verlust der Milz mit dem Leben zu vereinbaren ist, ist seit dem Altertum bekannt, die funktionelle Bedeutung des Organs ist jedoch erst in den letzten Jahren weiter aufgeklärt worden und ist noch Gegenstand der Forschung. Wir sehen die Milz heute nicht mehr als ein mehr oder minder überflüssiges Organ an, sondern als ein sehr wichtiges, das besonders bei Belastungen und in Notfallssituationen sehr nützlich ist. Für die Indikation zur Entfernung des rupturierten Organs hat dies keine Konsequenz, da die Naht und Tamponade ein wesentlich größeres Risiko in sich schließt als die Exstirpation, wohl aber für die Entfernung der pathologischen Milz. Hierbei ist ein Verstehen von oft schwierigen und komplexen Kreislauffunktionen, immunologischen und hormonalen Vorgängen sowie Zellbildungsstörungen notwendig. Für den Chirurgen bringt dies die Notwendigkeit mit sich, sich mit kreislaufphysiologischen, hämatologischen, immunologischen und endokrinologischen Fragen auseinanderzusetzen. Das vorliegende Buch soll dazu beitragen, dem Chirurgen physiologische und internistische Problemstellungen als Grundlagen der Splenektomie näher zu bringen und dem Internisten einige chirurgische Probleme aufzuzeigen. Es soll eine Übersicht über den heutigen Stand der Kenntnisse geben und der Zusammenarbeit sowie dem gegenseitigen Verständnis verschiedener Spezialrichtungen dienen.

SPRINGER-VERLAG · BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg. — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg
Printed in Germany